

I hereby certify that I have been publicly appointed and sworn in by the President of the Regional Court (Landgericht) No. I in Munich, Germany, as a translator for the English language. As such I further certify that the following text is a true and complete translation from German into English of a Patent Application filed by BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH with the German Patent Office on June 20, 1989, Application No. P 39 20 282.8.

So declared in Munich,
Federal Republic of Germany,
this 2nd day of August 1996



Helga Schrapp

Helga Schrapp

(publicly commissioned
and sworn-in translator)

12/099

DI Farn/St/Wa

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
6507 Ingelheim am Rhein

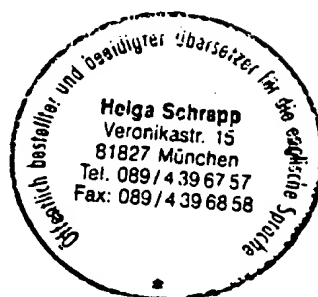
TNF receptor, TNF binding proteins and
DNAs coding therefor



The present invention relates to a TNF receptor and to a TNF binding protein.

Tumor necrosis factor (TNF- α) was found for the first time in the serum of mice and rabbits which had been infected with Bacillus Calmette-Guerin and had endotoxins injected thereinto, and was recognized because of its cytotoxic and antitumor characteristics (1). It is above all produced by activated macrophages and monocytes. Numerous cell types which are the targets for TNF have surface receptors with a high affinity for this polypeptide (2); it was assumed that lymphotoxin (TNF- β) binds to the same receptor (3, 4). TNF- α is identical with a factor designated as cachectin (5) which suppresses lipoprotein lipase and leads to hypertriglyceridemia in the case of chronic inflammatory and malign diseases (6, 7). TNF- α takes probably part in the regulation of growth and in the differentiation and function of cells which play a role in inflammations, immune processes and hematopoiesis.

TNF can exert a positive effect on the host organism by stimulation of neutrophils (8, 9) and monocytes and by inhibition of the replication of viruses (10, 11). Moreover, TNF- α activates the immune defense against parasites and acts directly and/or indirectly as a mediator in immunoreactions, inflammatory processes and other processes in the organism, the mode of action being not yet clear in many instances.



The administration of TNF- α (12) may, however, be accompanied by harmful phenomena (13), such as shock and tissue damage which can be counteracted by antibodies against TNF- α (14). A number of observations suggest that endogenously released TNF- α plays a role in various pathologic states. For instance, TNF- α seems to be a mediator of cachexia which arises in chronic invasive, for instance parasitary diseases. TNF- α also seems to play an important role in the pathogenesis of shocks caused by Gram-negative bacteria (endotoxin shock); it might take part in some, though not all, effects of lipopolysaccharides (18). Likewise, it has been claimed that TNF plays some part in tissue damage occurring within the frame of inflammatory processes in joints and other tissues and in the lethality and morbidity of the graft-versus-host reaction (GHVR, graft rejection (15)). Moreover, a connection between the concentration of TNF in serum and the deadly end of meningococcal diseases has been reported on (16).

Further, it has been found that the administration of TNF- α over a long period of time causes a state of anorexia and tabes with similar symptoms as cachexia which is accompanied by neoplastic and chronic infectious diseases (19).

There have been reports on a TNF-inhibiting activity of a protein from the urine of febrile patients whose effect is supposed to be due to a competitive mechanism on the receptor plane itself (20) (similar to the effect of the interleukin-1 inhibitor (17)).



EP-A2 308 378 describes a TNF inhibiting protein obtained from human urine. Its activity was detected in the urine of healthy and sick persons and determined because of the ability to inhibit the binding of TNF- α to its receptors on human HeLa cells and FS 11 fibroblasts and also the cytotoxic effect of TNF- α on murine A9 cells. This protein was substantially purified to homogeneity and characterized by its N-terminus. Although two basically possible methods are shown in this patent publication for obtaining the DNA coding for the protein and the recombinant protein, no specific information is given which one of the theoretically possible solutions is the successful one.

A protein that inhibits the biological effects of TNF- α by preventing the binding of TNF- α to its cell surface receptor through interaction with TNF- α could be identified in the dialysis urine of uremia patients in preliminary tests regarding the present invention (21). An affinity to TNF- β was also detected in this protein.

The presence of this protein (hereinafter called TNF-BP) in the concentrated dialysis urine was detected by competition with the binding of radioactively labeled recombinant TNF- α to a subclone of HL-60 cells, with measurements being made of the influence of dialyzed urine on the binding of ^{125}I -TNF- α to the cells. The binding tests as performed revealed a dose-dependent inhibition of the TNF- α binding to the cell by concentrated dialysis urine (the possible interpretation that the observed decrease in binding might be caused by TNF- α itself which possibly exists in urine, or by TNF- β



which competes for the binding, was ruled out by the finding that the decrease in binding could not be eliminated by use of TNF- α and TNF- β antibodies).

By analogy, proof could be furnished in preliminary tests regarding the present invention that TNF-BP has also an affinity to TNF- β ; it amounts to about 1/50 of its affinity to TNF- α .

It was found by means of gel chromatography on Sephacryl 200 that a substance in the urine and serum of dialysis patients and in the serum of healthy persons with recombinant TNF- α forms a complex having a molecular weight of about 75,000.

TNF-BP was enriched from several samples of dialysis urine of uremia patients by partial purification by means of pressure ultrafiltration, ion exchange chromatography and gel chromatography 62 times.

The resultant preparations were used for detecting the biological activity of TNF-BP by inhibiting the growth-inhibiting effect of TNF- α on HL-60-10 cells. A dose-dependent impact of TNF-BP on the biological activity of TNF- α was found. The binding characteristics of cells by pretreatment with TNF-BP and excluding competition binding test was further examined. Proof could be furnished that pretreatment of the cells with TNF-BP does not impair the binding of TNF- α to the cell. This shows that the effect of TNF-BP is not based on its possible binding to the cell and competition with TNF- α for the binding to the receptor.



The substantially homogeneous protein was obtained in highly purified form by concentrating the urine from dialysis patients by ultrafiltration, dialyzing the concentrated urine and enriching it in a first purification step by means of DEAE Sephacel chromatography to four times its amount. Further enrichment took place by means of affinity chromatography by TNF- α bound to Sepharose. Final purification was performed by means of reversed phase chromatography (FPLC).

It could be shown that the substantially highly purified protein inhibits the cytotoxic effect of TNF- α on WEHI 164 clone 13 cells (22).

The N-terminal amino acid sequence could be determined with respect to the substantially highly purified protein. It was defined as Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-(main sequence) (in addition the following N-terminal sequence was found in traces: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-(side sequence)). A comparison of the main sequence with the N-terminal sequence of the TNF inhibiting protein as disclosed in EP-A2 308 378 shows identity between the two proteins.

The following amino acid composition was determined, indicated in mol of amino acid per mol of protein and in mol % of amino acid determined as the mean value of a hydrolysis for 24 and 48 hours:



	Mol amino acid/ mol protein	mol % amino acid
Asp + Asn	27.5	10.9
Thr	15.8	6.3
Ser	20.7	8.2
Glu + Gln	35.0	13.8
Pro	9.5	3.8
Gly	16.0	6.3
Ala	4.2	1.7
Cys	32.3	12.8
Val	10.8	4.3
Met	1.1	0.4
Ile	7.0	2.8
Leu	20.2	8.0
Tyr	6.1	2.4
Phe	8.1	3.2
His	11.1	4.4
Lys	15.7	6.2
Arg	11.8	4.7
Total	252.9	100

A content of glucosamine was detected by means of amino acid analysis. The results of an affinoblot carried out with Concanavalin A and wheat germ lectin also show that TNF-BP is a glycoprotein.

The substantially homogeneous protein was tryptically digested and the amino acid sequences were determined out



of 17 of the cleavage peptides obtained. Furthermore, the C-terminus was analyzed.

TNF-BP has obviously the function of a regulator of the TNF activity with the ability to buffer the changes in concentration of free, biologically active TNF- α . TNF-BP might also influence the excretion of TNF by the kidney because the complex formed with TNF, whose molecular weight was determined by means of gel permeation chromatography on Sephadex G 75 to be about 75,000 was obviously not retained by the glomerulus, in contrast to TNF.

The TNF-BP was identified from the urine of dialysis patients as one of the three main protein components which show affinity to TNF and which jointly elute with TNF-BP from the TNF affinity chromatography column. The two other proteins, however, obviously bind in a manner which does not impair the binding of TNF- α to its cell surface receptor.

The results obtained with respect to the biological activity of the TNF-BP, in particular the comparison of the binding constant with the binding constant described for the TNF receptor (23) are a first sign that this protein might be the soluble part of a TNF receptor.

Because of its ability to inhibit the biological activity of TNF- α and TNF- β , the TNF-binding protein is suited for use at indications in which a reduction of the TNF activity in the organism is recommended. Derivatives or fragments of the TNF binding protein having the ability



to inhibit the biological activity of TNF are also suited for use in the case of such indications.

TNF-BP (or its functional derivatives or active fragments) can be used for the prophylactic and therapeutic treatment of the human or animal body in the case of indications in which a detrimental effect of TNF- α takes place. These diseases include, in particular, inflammatory and infectious and parasitary diseases or shocks wherein endogeneous TNF- α is released, further cachexia, GVHR and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, etc. These also include pathological states which may occur as side effects in the treatment with TNF- α , especially in case of high dosage, e.g. serious hypotension or disturbance of the central nerve system.

Pharmaceutical preparations for parenteral applications are especially suited as drugs, for instance in the form of lyophilisates or solutions, optionally together with physiologically compatible additives, such as stabilizers. Because of its TNF-binding properties, TNF-BP is also suited as a diagnostic agent for the determination of TNF- α and/or TNF- β , e.g. as one of the components in radioimmunoassays or enzyme immunoassays, optionally together with antibodies against TNF.

Because of its properties, this protein is a pharmacologically valuable active substance which being from natural sources cannot be represented in sufficient amounts by means of chemical protein methods.



There has therefore been a need to produce this protein (or related proteins with the ability to bind TNF) in a recombinant manner to provide it in sufficient amounts for therapeutic applications.

"Ability to bind TNF" is defined within the scope of the present invention as the property of a protein to bind to TNF- α such that the binding of TNF- α to the functional part of the receptor is prevented and the effect of TNF- α is inhibited or counteracted in human or animal organisms. This definition includes the ability of a protein to bind to other proteins, e.g. to TNF- β , and to inhibit the activity thereof.

It has been the object of the present invention to provide the DNA coding for TNF-BP to permit, on the basis thereof, the preparation of recombinant DNA molecules with the aid of which suitable host organisms can be transformed to produce TNF-BP or functional derivatives or fragments thereof.

It should also be determined within the scope of the present object whether TNF-BP is the soluble part of a TNF receptor so as to create the basis for the clarification of the receptor sequence by starting from such an assumption and to provide a recombinant TNF receptor.

The presence of a specific receptor having a high affinity for TNF- α on different types of cells was shown by several teams. The isolation and preliminary characterization of a TNF- α receptor have recently been reported on for the first time (32). Since the binding of



radioactively labeled TNF- α can be undone by a surplus of TNF- β (33), the suggestion has been made that TNF- α and TNF- β should share a common receptor. However, since it could be demonstrated that specific types of cells that are responsive to TNF- α are entirely or partly insensitive to TNF- β (34), doubts about the existence of a common receptor were again expressed. By contrast, recent results on the binding characteristics of TNF- β to receptors seem to corroborate the theory of a common receptor again (35), and it is pointed out in the paper that differences exist between TNF- α and TNF- β with respect to the interaction with the receptor and also with respect to the events occurring in the cell after an interaction between ligand and receptor.

The availability of the DNA coding for a TNF receptor is a prerequisite for the preparation of recombinant receptor and considerably facilitates, e.g., the conduction of comparative studies of different cell types as to their TNF- α and/or TNF- β -receptor(s) and the reactions initiated by the binding of TNF to the receptor in the cell. This, in turn, helps to clarify the three-dimensional structure of the receptor, thereby creating the precondition for a rational design for the development of agonists and antagonists of the TNF activity.

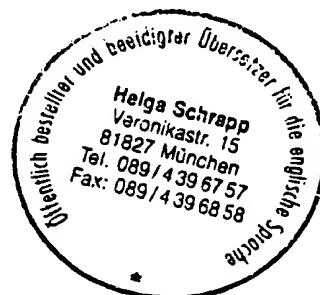
Screening of cDNA libraries with the aid of hybridizing probes that are derived from amino acid sequences of short peptides encounters major difficulties because of the degeneration of the genetic code. In addition, this procedure is rendered more difficult whenever one does



not know with respect to a protein, such as TNF-BP, in which tissues it is synthesized. In case of failure of such a method it might then not be possible to ascertain for sure whether this is due to the selection of an unsuitable cDNA library or to the inadequate specificity of the hybridizing probes.

To achieve the object as set forth, the procedure was therefore as follows according to the invention: A library of the fibrosarcoma cell line HS913 T which had been induced with TNF- α and was present in λ gt11 was used as the cDNA library. To obtain λ DNA with TNF-BP sequences from this library, the great sensitivity of the polymerase chain reaction (PCR, (26)) was exploited. (With the aid of this method it is possible to obtain from a whole cDNA library an unknown DNA sequence which is flanked by oligonucleotides designed on the basis of known partial amino acid sequences and used as primers. Such a longer DNA fragment can then be used as a hybridizing probe, for instance for isolating cDNA clones, especially the original cDNA clone).

The object was achieved according to the invention in that hybridizing probes were made on the basis of the N-terminal amino acid sequence (main sequence) and amino acid sequences of tryptic peptides which had been obtained from highly purified TNF-BP, and in that a cDNA which represents part of the cDNA coding for TNF-BP was obtained with the aid of these probes, first by means of PCR, from the cDNA library HS913T. This cDNA has the following nucleotide sequence:



CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT
 ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA
 GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC
 TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG.

This DNA represents one of possible variants suited for hybridizing with TNF-BP-DNAs or TNF-BP-RNAs. (Such variants include, e.g., those DNA molecules that are obtained by PRC amplification with the aid of primers whose nucleotide sequence does not exactly correspond to the sequence searched for, e.g. because of restriction sites intended for cloning purposes or because of amino acids that have e.g. not definitely been determined in the amino acid sequence analysis).

"TNF-BP-DNAs" and "TNF-BP-RNAs" are defined as being nucleic acids coding for TNF-BP or related proteins having the ability to bind TNF or nucleic acids which contain a sequence coding for such protein.

TNF-BP-DNAs (and TNF-BP-RNAs) also comprise cDNAs derived from mRNAs obtained by alternative splicing (or these mRNAs themselves). "Alternative splicing" means the removal of introns where different splice acceptor and/or splice donor sites are used from the same mRNA precursor. The resultant mRNAs differ from one another by the total or partial presence or absence of specific exon sequences, with a possible reading frame shift.

The cDNA (or variants thereof) which is first obtained according to the invention and contains part of the sequence coding for TNF-BP can thus be used as a hybridizing probe for obtaining TNF-BP-DNAs containing



cDNA clones from cDNA libraries. Furthermore, it can be used as a hybridizing probe for mRNA preparations to isolate TNF-BP-RNAs and to produce therefrom e.g. enriched cDNA libraries permitting a considerably simplified and more efficient screening. Another application is the isolation of the desired DNAs from genomic DNA libraries with the aid of these DNAs as hybridizing probes.

Since the above-defined DNA (or its variants) is capable of hybridizing with DNAs (or RNAs) coding for TNF-BP or containing the sequence coding for TNF-BP, it is also possible to obtain cDNAs coding for proteins with the aid of this DNA as the probe, the processing thereof yielding TNF-BP. Processing means the *in vivo* cleavage of partial sequences. As far as the N-terminus is concerned, this may be the signal sequence and/or other sequences and optionally, as far as the C-terminus is concerned, also the transmembranic and cytoplasmatic region of the receptor (provided the assumption is confirmed that TNF-BP represents the soluble part of a TNF receptor). It is therefore possible with the aid of this hybridizing probe to screen suitable cDNA libraries for the presence of cDNA containing the complete sequence coding for a TNF receptor. (If required, this process can be performed in several steps).

According to the invention the cDNA of the above-defined sequence, which had been obtained by means of PCR from the cDNA library of the TNF- α induced fibrosarcoma cell line HS913 T (in λ gt11), was used for the repeated screening of the cDNA library, the lambda-DNA was



prepared from the hybridizing clones, sucloned and sequenced. This led to a 1334 base-long cDNA insert containing the sequence coding for TNF-BP.

The present invention relates to a DNA coding for a polypeptide with the ability to bind TNF or for a polypeptide of which this TNF binding protein represents a partial sequence.

This also covers DNAs coding for parts of such polypeptides.

The complete nucleotide sequence of the longest cDNA insert obtained is illustrated in Fig. 1

This nucleotide sequence has a continuous open reading frame, starting with base 213, up to the end of the 1334 bp long cDNA inserts. Since in the same reading frame a stop codon is positioned 4 codons before the potential translation start codon ATG (213-215), it can be assumed that the start codon is in fact the translation start codon used in vivo.

A comparison between the amino acid sequence derived from the nucleotide sequence and the amino acid sequences determined from the amino-terminal end of TNF-BP and tryptic peptides shows that there is a high degree of correspondence. As a result, the isolated cDNA contains the sequence coding for the authentic TNF-BP.

Starting from the N-terminus, the first sequence corresponding to a tryptic peptide cleavage sequence is the sequence of fraction 12 (Leu-Val-Pro-...), which had



also been obtained as a side sequence in the analysis of the N-terminus of TNF-BP. This N-terminal leucine corresponds to the 30th amino acid in the cDNA sequence. Since the preceding segment of 29 amino acids is highly hydrophobic, and since TNF-BP is a secreted protein, the conclusion can be drawn that these 29 amino acids represent the signal peptide required for the secretion process, which is cleaved off during secretion (designated as S1-S29 in Fig. 1).

The amino acid sequence obtained as the main sequence in the N-terminal analysis of TNF-BP corresponds to the amino acids beginning with Asp-12 in the cDNA sequence. This asparagine acid residue directly follows the alkaline dipeptide Lys-Arg. Since a very great number of proteins are proteolytically cleaved in vivo after this dipeptide, it can be assumed that TNF-BP with N-terminal Asp is not directly obtained by processing a precursor during the secretion process, but that the N-terminal 11 amino acids are cleaved off from the processed protein by extracellular proteases at a later time.

The carboxy-terminal end of TNF-BP had been determined as Ile-Glu-Asn (C-terminal analysis; tryptic peptide fraction 27: amino acids 159-172, tryptic peptide fraction 21: amino acids 165-172), with Asn corresponding to the position 172 in the cDNA sequence.

Potential N-glycosylation sites of the general formula Asn-X-Ser/Thr, where X may be any desired amino acid except for proline, are at the positions 25-27 (Asn-Asn-Ser), 116-118 (Asn-Cys-Ser) and 122-124 (Asn-Gly-Thr) of the TNF-BP cDNA sequence). (The assumption that Asn-25 is glycosylated follows from the fact that when the



corresponding tryptic cleavage peptide was sequenced Asn could not be identified at this site).

The analysis of the nucleotide sequence and of the amino acid sequence derived therefrom shows in connection with the performed chemical protein assays that TNF-BP is a glycosylated polypeptide having 172 amino acids, which is converted by proteolytic cleavage after the 11th amino acid into a glycoprotein with 161 amino acids.

The following table shows the sequenced tryptic peptides and the corresponding amino acid sequences derived from the cDNA sequence:

Fraction	Amino Acids	

12	1- 8	
1	12- 19	
8	20- 32	
14/I	36- 48	
20	36- 53	
11	54- 67	(amino acids 66-67 had not correctly been determined on the peptide)
14/II	79- 91	
26	133-146	
5	147-158	
27	159-172	

The resultant cDNA is the prerequisite for the production of recombinant TNF-BP.



Hence, the subject matter of the invention is also DNA coding for preferably secretable TNF-BP.

TNF-BP which is secreted into the cell supernatant can be produced by introducing a DNA construct containing the sequence coding for TNF-BP with a sequence coding for a signal peptide under control of a suitable promoter in suitable host organisms, expediently in eukaryotic, preferably higher eukaryotic cells.

When a signal peptide is used with respect to the secretion of the protein, the DNA coding for the signal peptide is expediently inserted before the codon for Asp-12 to obtain a uniform product. As a rule, any signal peptide is suited that guarantees the secretion of the mature protein in the corresponding host organism. Optionally the signal sequence can also be placed before the triplet coding for the Leu-1, and in such a case it might be necessary to separate the TNF-BP form created at the N-terminus by cleavage of the peptide consisting of 11 amino acids, from the unprocessed or not completely processed TNF-BP in an additional purification step.

Since the cDNA after the codon for Asn-172, which represents the C-terminus because of the C-terminal analysis, does not contain a stop codon, a translation stop codon is expediently incorporated after the codon for Ans 172 by directed mutagenesis with respect to the expression of TNF-BP.



The DNA coding for TNF-BP may be modified by mutation, transposition, deletion, addition or shortening, provided that such modified DNAs code for (poly)peptides having the ability to bind TNF. Such modifications may be changes of one or more of the potential glycosylation sites, which may perhaps not be required for biological activity, by replacing e.g. the Asn codon by a triplet coding for another amino acid. Taking into account that the biological activity is retained, modifications may be performed, which result in changes of the disulfide bridges (for example reducing the number thereof).

Hence, the stated DNA molecules are a precondition for the construction of recombinant DNA molecules, which are also the subject matter of the present invention. Suitable host organisms can be transformed and grown and the protein can be obtained with such recombinant DNA molecules in the form of expression vectors containing the DNA coding for a protein with TNF-BP activity and optionally modified in a suitable manner, preferably with a preceding signal sequence, and the control sequences required for the expression of the protein.

Like with possible modifications of the DNA sequence, host organisms suited for the expression are selected, particularly with respect to the biological activity of the protein to bind TNF. Moreover, the standard criteria applicable in the production of recombinant proteins, e.g. compatibility with the selected vector, processing capacity, isolation of the protein, expression characteristics, safety and cost aspects play also a role in the decision on the host organism. The selection of a



suitable vector also follows from the host intended for the transformation. As a rule, all vectors are suited that replicate and express the DNAs coding for TNF-BP according to the invention (or modifications thereof).

With respect to the biological activity of the protein, it is especially the possible relevance of the criteria determined in the natural protein, namely glycosylation and high amount of cysteine residues, that must be paid attention to as to the property to bind TNF as far as the expression of the TNF-BP coding DNA is concerned. Therefore, eukaryotes, especially suitable expression systems of higher eukaryotes, are used for the expression.

Since the recombinant polypeptides of the invention are able to bind TNF, they are suited for use in the prophylactic and therapeutic treatment of the human or animal body in the case of indications where a detrimental effect of TNF- α takes place.

Since a TNF- α inhibiting effect was also detected in TNF-BP, it (or the related or modified polypeptides) can be used in suitable dosage, optionally in a form modified with respect to an enhanced affinity to TNF- β , also for inhibiting the effect of TNF- β in the organism.

Furthermore, the subject matter of the present invention are therefore pharmaceutical preparations containing an amount of TNF-BP effectively inhibiting the biological activity of TNF- α and/or TNF- β , or a related polypeptide with the ability to bind TNF.



As already mentioned, after the codon for Asn-172 the cDNA does not contain the stop codon that would have to be expected by reason of the analysis of the C-terminus, but the open reading frame is continued. The region between Val-183 and Met-205 shows highly hydrophobic characteristics. This hydrophobic region of 22 amino acids, followed by a segment having a content of positively charged amino acids (Arg-206, Arg-209), exhibits the typical features of a transmembrane domain which anchors proteins in the cell membrane. By contrast, the protein portion following in the direction of the C-terminus is again highly hydrophilic.

The hydrophobicity profile is plotted in Fig. 2. (The hydrophobicity plot was made with the aid of the Mac Molly program (Soft Gene Berlin); the window width for the calculation of the values was 11 amino acids. Hydrophobic regions correspond to positive values, hydrophilic regions to negative values on the ordinate. The number of the amino acids, beginning with the start methionine S1, is shown on the abscissa).

As follows from the protein structure, the DNA coding for the soluble secreted TNF-BP is part of a DNA coding for a larger protein: This protein exhibits the features of a protein anchored in the cell membrane, contains TNF-BP in a manner typical of an extracellular domain and has a considerable segment typical of cytoplasmatic domains. Soluble TNF-BP is obviously obtained from this membrane-bound form by proteolytic cleavage just outside of the transmembrane domain.



The structure of the protein encoded from the obtained cDNA, together with the ability of TNF-BP to bind TNF, confirms the assumption that TNF-BP is part of a cellular surface receptor for TNF whose extracellular domain responsible for the binding of TNF can be cleaved off proteolytically and is found again in the form of the soluble TNF-BP. (This shall not rule out a situation in which with respect to the functional performance of the receptor said protein is possibly associated with one or several other proteins).

(For the production of TNF-BP on a large scale it is advantageous not to start from the whole cDNA because attention would have to be paid to the requirement that TNF-BP has to be cleaved off from the part of the protein that represents the membrane-bound part of the TNF receptor. Rather, as already stated, a translation stop codon is expediently inserted after the codon for Asn-172 by directed mutagenesis to prevent any kind of protein synthesis from going beyond the C-terminal end of TNF-BP.)

With the cDNA obtained according to the invention, which represents a partial sequence of the DNA coding for a TNF receptor, it is possible to obtain the complete receptor sequence by amplifying the missing 3' end, for instance, by means of modified PCR (RACE = "rapid amplification of cDNA ends" (36)) with the aid of a primer which was constructed on the basis of a sequence situated as much as possible towards the 3' end of the existing cDNA.



An alternative method is the conventional screening of the cDNA library with the available cDNA or parts thereof as the probe.

The subject matter of the present invention is thus also the DNA coding for a human TNF receptor and containing the in vivo translated segment of the cDNA obtained according to the invention, or degenerated variants thereof. This definition comprises DNAs coding for forms which are C-terminal and/or N-terminal shortened, e.g. processed, or for modified forms (for example by changes at proteolytic cleavage sites, glycosylation sites or certain regions of the domains) or for fragments, e.g. the various domains of the TNF receptor.

In combination with the control sequences required for the expression, these DNAs can be used as part of recombinant DNA molecules for the transformation of prokaryotic or eukaryotic host organisms. On the one hand, this paves the way for the production of the TNF receptor in large quantities in a recombinant process, for instance, in order to be able to clarify the three-dimensional structure of the receptor. On the other hand, higher eukaryotic cells can be transformed with these DNAs to make studies on the mechanisms and dynamics of the TNF/receptor interaction, the signal transfer or on the relevance of the various receptor domains or segments thereof. The recombinant TNF receptor (or fragments or modifications thereof) can be used for examining substances as to their interaction with TNF or the TNF receptor and their impact on the signal transfer induced by TNF. Such screenings (using proteins/fragments or



correspondingly transformed higher eukaryotic cells) constitute the precondition for the identification of substances substituting TNF, inhibiting its binding to the receptor, or such substances that can block or intensify the mechanism of the signal transfer initiated by TNF.

The scope of the present invention also covers nucleic acids which do not code for TNF-BP or the receptor, but which hybridize with the cDNA obtained according to the invention under conditions of lower stringency.

The above problem was solved in detail as follows:

As regards the highly purified TNF-BP, the N-terminal amino acid sequence and the amino acid sequences of peptides obtained by tryptic digestion of the protein were determined.

Furthermore, the C-terminus was determined by carboxypeptidase P, digestion, derivatization of the cleaved amino acids and chromatographic separation.

As regards the peptide sequences obtained by tryptic digestion, and with respect to the use thereof in the PCR for the preparation of oligonucleotides, regions were selected, on the one hand, from the N-terminus and, on the other hand, from a tryptic peptide in such a manner that the complexity of mixed oligonucleotides was as low as possible as for hybridization with cDNA. Based on these two regions, a respective set of mixed oligonucleotides were prepared, the one derived from the



region at the N-terminus being synthesized in accordance with the mRNA and the one derived from the tryptic peptide being synthesized in a reversely complementary manner with respect to the mRNA. To facilitate subsequent cloning of a PCR amplified segment, the set of oligonucleotides derived from the tryptic peptide were provided with a BamHI restriction site. λ DNA was then isolated from the TNF- α induced fibrosarcoma cDNA library and a TNF-BP sequence was amplified therefrom by means of PCR. The resultant fragment was cloned and sequenced; it had 158 nucleotides and contained the sequence coding for the tryptic peptide 20 between the two sequence segments derived from the primer oligonucleotides.

This DNA fragment was subsequently radioactively labeled and used as a probe for isolating cDNA clones from the fibrosarcoma library. The procedure was such that plaques were first hybridized with the probe, phages of hybridized plaques were isolated and λ DNA was obtained therefrom. Individual cDNA clones were subcloned and sequenced; two of the characterized clones contained the sequence coding for TNF-BP.

The invention is illustrated in more detail with reference to the following preliminary tests and examples:

Preliminary Test 1

Preparation of highly purified TNF-BP

a) Concentration of urine



200 l of dialysis urine of uremia patients, stored in bottles containing EDTA (10 g/l), Tris (6 g/l), NaH_3 (1 g/l) and benzamidine hydrochloride (1 g/l) and stored at a cool place, were concentrated by ultrafiltration by means of a highly permeable hemocapillary filter with an asymmetrical hollow fiber membrane (FH 88H, Gambro) to 4.2 l with a protein content of 567 g. The concentrated urine was dialyzed against 10mM/l Tris HCl, pH 8. During this process, and like in the subsequent steps (except for reversed-phase chromatography), 1mM/l benzamidine hydrochloride was added to counteract proteolytic digestion. All of the subsequent purification steps were performed at 4°C, unless stated otherwise.

b) Ion Exchange Chromatography

This step was performed by charging DEAE Sephacel columns (2.5 x 40 cm) with samples of concentrated and dialyzed urine containing about 75 g protein each. Elution was carried out with 800 ml of an NaCl/10mM Tris/HCl pH-8 gradient, the NaCl concentration amounting to 0 to 0.4 M. The fractions of seven columns containing the TNF-BP, having a total protein content of 114 g, were stored at -20°C.

c) Affinity Chromatography

To prepare the TNF Sepharose column, rTNf- α (15 mg) in 0.1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 9 (coupling buffer) was coupled to 1.5 g cyanogenic bromide-activated Sepharose 4B (Pharmacia). The Sepharose was swollen in 1mM HCl and



washed with coupling buffer. After addition of rTNF- α the suspension was rotated at room temperature for 2 hours. The excess of CNBr groups was blocked by rotation for one and a half hours with 1M ethanolamine, pH 8. The TNF Sepharose was alternately washed several times in 1M NaCl, 0.1 M sodium acetate pH 8 and 1 M NaCl, 0.1 M boric acid pH 4 and subsequently stored in phosphate-buffered saline with 1 mM benzamidine hydrochloride. The fractions obtained from step b) were set to a concentration of 0.2 M NaCl, 10mM Tris/HCl, pH 8. The TNF Sepharose was packed into a column and washed with 0.2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8, and the TNF-BP containing fractions corresponding to about 30 g protein, were applied at a flow rate of 10 ml/h and profusely washed with 0.2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8 until an absorption could no longer be detected in the eluate at 280nm. TNF-BP was then eluted with 0.2 M glycine/HCl, pH 2.5.

TNF-BP containing fractions of 4 separations were combined and lyophilized up to an end concentration of 10 mg/ml after addition of polyethyleneglycol (MG 6000). The lyophilized sample was dissolved in distilled water and dialyzed against distilled water. (The dialyzed sample (4 ml) was stored in a deeply frozen state.)

This purification step led to a further enrichment by about 9000 times as compared with the preceding step. SDS-PAGE (performed as described in preliminary test 2) of the TNF-BP containing fractions showed the elution of three main components with molecular weights of 28,000, 30,000 and 50,000.



d) Reversed Phase Chromatography

An aliquot amount (1 ml) of the fractions obtained from step c) with an addition of 0.1% trifluoroacetic acid was applied to a ProRPC HR 5/10 column (Pharmacia) connected to an FPLC system (Pharmacia). The column was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid and charged at room temperature with a linear 15 ml gradient of 10 volume percent to 50 volume percent of acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid; the flow rate was 0.3 ml/min. Fractions of 0.5 ml were collected and the absorption at 280 as well as the activity of the TNF- α binding protein were determined with the aid of the competition binding test, as indicated in Example 1, with 0.01 μ l sample being respectively used. TNF-BP eluted as a single activity peak according to a sharp UV absorption peak.

This last purification step yielded an increase in specific activity by about 29 times; the total increase in activity as compared with the starting material (concentrated dialysis urine) amounted to about 1.1×10^6 times.

SDS-PAGE of the reduced and non-reduced sample, carried out as indicated in preliminary test 2, yielded a diffuse band which pointed to the presence of a single polypeptide with a molecular weight of about 30,000. The diffuse appearance of the bands might be due to the presence of one or more heterogenous glycosylations and/or a second polypeptide present in a small amount. The assumption that this might be a polypeptide having the N-terminus determined as a side sequence in



preliminary test 3d, which polypeptide is extended at the N-terminus as compared with TNF-BP, was confirmed by the sequence of the cDNA according to which a segment of 11 amino acids is present between the signal sequence and Asn (pos. 12), the sequence of the segment corresponding to the N-terminal side sequence and the segment being obviously cleaved off from the processed protein.

Preliminary Test 2

SDS Polacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was carried out according to the method of Laemmli (24) on flat gels having a length of 18 cm, a width of 16 cm and a thickness of 1.5 mm and 10 pockets by means of an LKB 2001 electrophoresis unit. The protein content of the samples from purification steps c) and d) (preliminary test 1) was determined by means of Bio-Rad Protein Assay and calculated from the absorption at 280 nm, with a content of 1 mg TNF-BP/ml being assigned to an absorption of 1.0.

The samples containing about 25 μ g protein (from preliminary test 1c) and about 5 μ g (from 1d) in reduced (β -mercaptoethanol) and non-reduced form were applied to a 3% concentration gel and a 5% to 20% linear polyacrylamide gradient gel. Electrophoresis was performed at 25mA/gel without cooling. Phosphorylase B (MW 94,000), bovine serum albumin (MW 67,000), ovalbumin (MW 43,000), carboanhydrase (MW 30,000), soybean trypsin inhibitor (MW 20,100) and α -laktalbumin (MW 14,400) were used as molecular weight markers (Pharmacia). The gels



were stained with Coomassie blue in 7% acetic acid/40% ethanol and destained in 7% acetic acid/25% ethanol.

The result of the SDS-PAGE showed TNF-BP as a polypeptide chain with a molecular weight of about 30,000.

Preliminary Test 3

a) Sample Preparation

15 μ g of the protein purified according to the preliminary test 1d) were desalted via reversed phase HPLC and further purified. To this end a Bakerbond WP C18 column (Baker; 4.6 x 250 mm) and 0.1% trifluoroacetic acid were used in water (eluent A) and in acetonitrile (eluent B) as the mobile phase. The increase in gradient was 20% to 68% of eluent B in 24 min. Detection was performed at 214 nm and at 280 nm at the same time. The TNF-BP containing fraction was collected, dried and dissolved in 75 μ l 70% formic acid and directly used for the amino acid sequence analysis.

b) Amino Acid Sequence Analysis

The automatic amino acid sequence analysis was performed with an Applied Biosystems 477 A Liquid Phase Sequenator by on-line determination of the released phenylthiohydantoin derivatives by means of an Applied Biosystems Analyzer, model 120 A PTH. It showed the following N-terminal sequence as the main sequence: (about 80% of the protein amount): Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-.



Apart from this, the following side sequence could be detected: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-. (The amino acids put into brackets could not be clearly identified.)

Preliminary Test 4

SDS-PAGE

The sample preparation was performed in the same manner as in the preliminary test 3, except for the difference that the sample amount was 10 μ g. The sample was received in 50 μ l water and divided into 4 portions. One of the four aliquot parts was reduced by means of SDS-PAGE according to the method of Laemmli (24) with DTT (dithiothreitol) and separated on minigels (Höfer, 55x80x0.75mm, 15%); the marker as indicated in preliminary test 8 was used as the molecular weight marker. Staining was performed according to the Oakley method (25). The electrophoretogram is illustrated in Fig. 9. It shows a single band at a molecular weight of about 30,000.

Example 1

a) Tryptic Peptide Mapping

About 60 μ g of the protein purified according to preliminary test 1d) were desalted via reversed phase HPLC and thus further purified. To this end a Bakerbond WP C18 column (Baker; 4.6 x 250 mm) and 0.1% trifluoroacetic acid were used in water (eluent A) and in



acetonitrile (eluent B) as the mobile phase. The gradient increase was 20% to 68% of eluent B in 24 min. Detection was in parallel at 214 nm and at 280 nm. The TNF-BP containing fraction (retention time: about 13.0 min) was collected, dried and dissolved in 60 μ l 1% ammonium bicarbonate.

1% w/w, corresponding to 0.6 μ g trypsin (Boehringer Mannheim), was added to this solution and the reaction mixture was incubated at 37°C for 6 hours. 1% w/w trypsin was once again added and incubation was continued overnight.

For the reduction of the disulfide bridges the reaction batch had then added thereto 60 μ l 6 M urea and 12 μ l of 0.5 M dithiothreitol and was allowed to stand at room temperature for 2 hours.

The resultant tryptic cleavage peptides were separated via reversed phase HPLC, a Delta PAK C18 column (Waters, 3.9 x 150 mm, 5 μ m particle diameter, 100 Å pore diameter) being used at 30°C and 0.1% trifluoroacetic acid in water (eluent A) and in acetonitrile (eluent B) as the mobile phase. The gradient increase was 0 to 55% of eluent B within 55 min; 55% B was then maintained for 15 min. The flow rate was 1 ml/min; detection was in parallel at 214 nm (0.5 AUFS) and at 280 nm (0.05 AUFS).

b) Sequence Analysis of Tryptic Peptides

Some of the tryptic cleavage peptides of TNF-BP obtained according to a) were subjected to automatic amino acid



sequence analysis. To this end the corresponding fractions from reversed phase HPLC were collected, dried and dissolved in 75 μ l 70% formic acid. These solutions were directly used for sequencing in an Applied Biosystems 477 A Pulsed Liquid Phase Sequenator. Table 1 shows the results of the sequence analysis of the tryptic peptides; the amino acids put into brackets could not be identified for sure. The indication "X" means that the amino acid could not be identified at this position. The amino acid at position 6 could not be identified in fraction 8. The sequence -X-N-S- for the position 6-8 presumably indicates that the amino acid 6 is present in glycosylated form.

In fraction 17 the amino acid in position 6 could also not be identified. The sequence -X-N-S (already appearing in fraction 8) for the positions 6 to 8 might indicate that the amino acid 6 is present in glycosylated form. The first 13 amino acids of fraction 17 are largely identical with fraction 8; thus fraction 17 is probably a peptide obtained by incomplete tryptic cleavage.

The identity of fraction 21 with the positions 7 to 14 of fraction 27 is striking. Both in fraction 21 and in fraction 27 the sequence is suddenly interrupted after the amino acid asparagine (positions 8 and 14) although a tryptic cleavage has not to be expected there. This might indicate that the amino acid asparagine (position 8 in fraction 21 and position 14 in fraction 27) could be the C-terminal amino acid of TNF-BP.

The substantial identity between the sequence of fraction 12 appearing only in a small amount and the side sequence



of the N-terminus determined in the preliminary test 10 is striking. The fact that the proteins of the main and side sequences could not be separated on an analytical reversed-phase HPLC column (preliminary test 3b) indicated that the protein with the side sequence is a form of TNF-BP extended at the N-terminus, which is converted by processing substantially into the protein with the main sequence.

Fraction Amino Acid Sequence

1	D - S - V - C - P - Q - G - K
2	X - X - L - S - (C) - S - K
3	D - T - V - (C) - G - (C) - R
4	E - N - E - (C) - V - S - (C) - S - N - (C) - K
5	E - N - E - (C) - V - S - (C) - (S) - N - (C) - K - (K)
8	Y - I - H - P - Q - X - N - S - I - X - X - X - K
11	E - C - E - S - G - S - F - T - A - S - E - N - (N) - (K)



- 12 L - V - P - H - L - G - D - R
- 13 K - E - M - G - Q - V - E - I -
S - S - (C) - T - V - D - (R)
- 14/I G - T - Y - L - Y - N - D - C -
P - G - P - G - Q -
- 14/II (E) - M - G - Q - V - (E) - (I) -
(S) - X - X - X - (V) - (D) -
- 15 K - E - M - G - Q - V - E - I -
S - S - (C) - T - V - D - R - D -
T - V - (C) - G -
- 17 Y - I - H - P - Q - X - N - S -
I - (C) - (C) - T - K - (C) - H -
K - G - X - Y -
- 20 G - T - Y - L - Y - N - D - C -
P - G - P - G - Q - D - T - X -
X - R
- 21 L - (C) - L - P - Q - I - E - N
- 26 Q - N - T - V - (C) - T - X - (H) -
A - G - F - (F) - L - (R)
- 27 S - L - E - (C) - T - K - L -
(C) - L - P - Q - I - E - N



Table 1: Amino acid sequences of the analyzed tryptic peptides of TNF-BP

Example 2

Analysis of the C-terminus

This analysis was performed in accordance with the principle of the method described in (31).

About 60 μ g of the protein purified according to preliminary test 2d) were desalted via reversed phase HPLC and thus further purified. To this end a Bakerbond WP C18 column (Baker; 4.6 x 250 mm) and 0.1% trifluoroacetic acid in water (eluent A) and in acetonitrile (eluent B) were used as the mobile phase. Gradient increase was 20% to 68% of eluent B in 24 min. Detection was in parallel at 214 nm and at 280 nm. The TNF-BP containing fraction (retention time about 13.0 min) was collected, dried and dissolved in 120 μ l 10 mM sodium acetate (set to pH 4 with 1 N HCl).

6 μ l Brij 35 (10 mg/ml in water) and 1.5 carboxypeptidase P (0.1 mg/ml in water, Boehringer Mannheim, No. 810142) were added to this solution. This corresponds to a weight ratio of enzyme to protein of 1 to 400 (36).

A sample of 20 μ l was taken from the reaction mixture immediately after addition of the enzyme and the enzymatic reaction was interrupted by acidification with



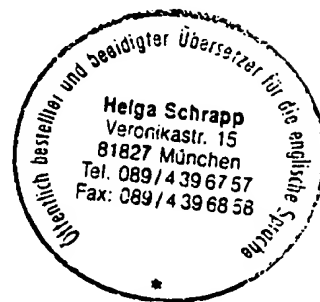
2 μ l of concentrated trifluoroacetic acid and by freezing at -20°C .

The reaction mixture was allowed to stand in the refrigerator (about 8°C), and samples of 20 μ l each were taken after 10, 20, 60 and 120 minutes. The rest of the reaction mixture was left at room temperature for another 120 minutes. Immediately after removal all of the samples were acidified by addition of 2 μ l of concentrated trifluoroacetic acid and frozen at -20°C , whereby the enzymatic reaction was interrupted.

In parallel with the described sample batch with about 60 μg TNF-BP, a blank reagent value, which had no protein added thereto, was used under identical conditions.

After the last sampling all samples were dried in a Speed Vac Concentrator for 30 minutes, mixed with 10 μ l of a solution consisting of 2 parts of ethanol, 2 parts of water and 1 part of triethylamine (= "Redrying Solution" of the Picotag Amino Acid Analysis System of Waters) and once again dried for a short period. The samples were then mixed with 20 μ l each of the "Derivatization Reagent" (7:1:1:1 = ethanol : water : triethylamine : phenylisothiocyanate; Picotag System) for the derivatization of the amino acids cleaved off from the C-terminus, allowed to stand at room temperature for 20 minutes and then dried in a Speed Vac Concentrator for 1 hour.

The samples were dissolved in 100 μ l "Sample Diluent" (Picotag System of Waters) for analyzing the derivatized



amino acids. Of these solutions 50 μ l each were analyzed with the aid of reversed phase HPLC (column, mobile phase and gradient according to the original instructions of the Picotag system of Waters). The chromatograms of the samples and the blank reagent values were compared with the chromatogram of an analogously derivatized mixture (100 pmole/amino acid) of standard amino acids (Beckman).

As becomes apparent from the quantitative results of the Picotag amino acid analysis (Table 2), it is very likely that asparagine is the C-terminal amino acid of TNF-BP. Apart from asparagine, glutamic acid and a small amount of isoleucine could be identified after a reaction time of 240 minutes. Amounts of other amino acids significantly lying above the blank reagent value could not be found even after a reaction time of 240 minutes. This result (-I-E-N as the C-terminus) supports the assumption derived from the N-terminal sequencing of the tryptic peptides 21 and 27 that the amino acids -I-E-N (Example 1b) identified at the C-terminus in these peptides represent the C-terminus of TNF-BP.



Reaction time	Integration units for the amino acids		
	Isoleucine	Glutamic Acid	Asparagine
0	-	-	-
10	-	-	-
20	-	-	83,304
60	-	-	168,250
120	-	-	319,470
240	85,537	152,350	416,570

Table 2: Quantitative evaluation of the Picotag amino acid analysis after reaction of carboxypeptidase P with TNF-BP.

Methods regarding Examples 3 to 7:

To simplify the description of the following examples, methods or designations that will often recur shall briefly be described in the following:

"Cutting" or "digesting" of DNA refers to the catalytic cleavage of DNA by means of restriction endonucleases (restriction enzymes) at sites (restriction sites) specific thereof. Restriction endonucleases are commercially available and are used under conditions recommended by the manufacturers (buffer, bovine serum albumin (BSA) as carrier protein, dithiothreitol (DTT) as protection against oxidation). Restriction endonucleases are designated by a capital letter, most of the time



followed by small letters and normally a Roman numeral. The letters depend on the microorganism from which the corresponding restriction endonuclease was isolated (for instance: Sma I: *Serratia marcescens*). About 1 μg DNA is normally cut with one or several units of the enzyme in about 20 μl buffer solution. Normally, there is an incubation period of 1 hour at 37°C, but it may be varied in accordance with the manufacturer's instructions of use. After cutting the 5' phosphate group is sometimes removed by incubation with alkaline phosphatase of calf intestine (CIP). This helps to prevent an undesired reaction of the specific site in a subsequent ligation reaction (e.g. circularization of a linearized plasmid without insertion of a second DNA fragment). Unless stated otherwise, DNA fragments are normally not dephosphorylated after cutting with restriction endonucleases. Reaction conditions for the incubation with alkaline phosphatase can e.g. be gathered from the M13 Cloning and Sequencing Handbook (Amersham, PI/129/83/12). After incubation protein is removed by extraction with phenol and chloroform and the DNA is precipitated from the aqueous phase by addition of ethanol.

"Isolating" a specific DNA fragment means the separation of the DNA fragments obtained by restriction digestion, e.g. on a 1% agarose gel. After electrophoresis and visualization of the DNA in UV light by staining with ethidium bromide (EtBr) the desired fragment is localized with the help of molecular weight markers that have also been applied, and is bound by further electrophoresis to DE 81 paper (Schleicher and Schüll). The DNA is washed by



rinsing with low-salt buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH = 7.5, 1 mM EDTA) and subsequently eluted with a high-salt buffer (1 M NaCl, 20 mM tris pH = 7.5, 1 mM EDTA). The DNA is precipitated by addition of ethanol.

"Transformation" means the incorporation of DNA into an organism, so that the DNA can be replicated there, integrated either extrachromosomally or chromosomally. Transformation of E.coli is in line with the method indicated in the M13 Cloning and Sequencing Handbook (Amersham, PI/129/83/12).

"Sequencing" of a DNA means the determination of the nucleotide sequence. To this end the DNA to be sequenced is first cut with different restriction enzymes, and the fragments are incorporated into correspondingly cut M13 mp8, mp9, mp18 or mp19 double-strand DNA, or the DNA is fragmented by means of ultrasonics, the ends are repaired and the size-selectionated fragments are incorporated into Sma I cut, dephosphorylated M13 mp8 DNA (Shotgun Method). After transformation of E.coli JM 101 single-strand DNA is isolated from recombinant M13 phages according to the M13 Cloning and Sequencing Handbook (Amersham, PI/129/83/132) and sequenced according to the dideoxy method (30). An alternative to the use of the Klenow fragment of the E.coli DNA polymerase I is the T7-DNA polymerase ("Sequenase", United States Biochemical Corporation). The sequence reactions are carried out in accordance with the manual "Sequenase: Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing with Sequenase" (Version 2.0).



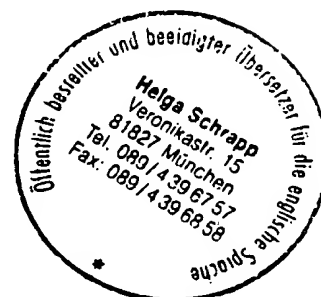
Another sequencing method is the cloning of the DNA to be sequenced in a vector which, inter alia, carries a replication origin of a DNA single-strand phage (M13, f1) (e.g. Bluescribe or Bluescript M13 of Stratagene). After transformation of E. coli JM101 with the recombinant molecule the transformants can be infected with a helper phage, e.g. M13K07 or R408 of Promega). As a result, a mixture of helper phages and packed, single-stranded recombinant vector is obtained. The sequencing template is processed by analogy with the M13 method.

The sequences were evaluated by means of computer programs originally developed by R. Staden (27) and modified by CH. Pieler (28).

"Ligating" means the process of forming phosphodiester bonds between two ends of double-stranded DNA fragments. Between 0.02 and 0.2 μg DNA fragments in 10 μl are normally ligated with about 5 units T4-DNA ligase in a suitable buffer solution (29: 474).

"Preparation" of DNA from transformants means the isolation of the plasmid DNA from bacteria by means of the alkaline SDS method, modified according to Birnboim and Doly (29: 368-369), under omission of the lysozyme. The bacteria from 1.5 to 50 ml culture are used.

"Oligonucleotides" are short polydeoxynucleotides which are chemically synthesized. The Applied Biosystems Synthesizer model 381A was used therefor. The oligonucleotides are processed according to the model 381A User Manual (Applied Biosystems). Sequence primers are directly used without further purification. Other oligonucleotides are purified up to a chain length of 70



by the "OPC" method (OPC = oligonucleotide purification column, Applied Biosystems, Product Bulletin, January 1988). Longer oligonucleotides are purified by polyacrylamide gel electrophoresis (6% acrylamide, 0.15% bisacrylamide, 6 M urea, TBE buffer) and desalted after elution from the gel via a G-25 Sepharose column.

Example 3

Preparation of TNF-BP Specific Hybridizing Probes

The oligonucleotides were selected by means of PCR with respect to the use thereof for amplifying cDNA:

- a) A heptapeptide region which permits the lowest complexity of a mixed oligonucleotide for hybridization on cDNA was selected from the N-terminal amino acid sequence of the TNF binding protein (main sequence obtained from preliminary test 3 and Example 1, fraction 1)

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-
His-Pro-Gln-.

These are the amino acids 6 to 12. To reduce the complexity of the mixed oligonucleotide, four mixed oligonucleotides were produced with a complexity of 48 each. The oligonucleotides were prepared in the direction of the mRNA; they are thus oriented towards the 3' end of the sequence and are identical with the noncoding strand of the TNF-BP gene:



Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro

5'CAA GGT AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/1 EBI-1639

G G C C C
A

5'CAA GGC AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/2 EBI-1640

G G C C C
A

5'CAA GGA AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/3 EBI-1641

G G C C C
A

5'CAA GGG AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/4 EBI-1642

G G C C C
A

- b) A peptide region was selected from the amino acid sequence of a tryptic peptide (fraction 11 of the tryptic digest) of the amino acid sequence

Glu-Cys-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-(Glu/Cys)-Asn-Asn-Lys
(cf. Example 1),

and another set of mixed oligonucleotides were synthesized:

-Phe-Thr-Ala-Ser-Glu-Asn-Asn-Lys

Cys

TNF-BP #4/5 (EBI-1653):

3'AAA TGA CGG AGA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'

G G T T T
T



TNF-BP #4/6 (EBI-1654):

3'AAA TGA CGG TCA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T G T
 T

TNF-BP #4/7 (EBI-1657):

3'AAA TGA CGG AGA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T T G
 T

TNF-BP #4/8 (EBI-1658):

3'AAA TGA CGG TCA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 G G T G G
 T

The oligonucleotides were synthesized complementary to the mRNA and are thus oriented towards the 5' end of the sequence. To be able to efficiently clone the amplified DNA fragment following the PCR, a BamHI liner was also provided at the 5' end of the oligonucleotides. For instance, if the oligonucleotides TNF-BP #4/5-8 are jointly used with TNF-BP #3/1-4 for the PCR on the whole λ -DNA of a library, a possibly resulting DNA fragment can be further cut with BamHI. The partner oligonucleotides yield a straight end at the 5' terminus, the fragment can thus be cloned into the SmaI-BamHI sites of a suitable vector. Each mixed oligonucleotide TNF-BP #4/5-8 is a mixture of 48 individual nucleotides and does not take into account a few codons, namely:



Thr	ACG
Ala	GCG and GCT
Ser	TCG and TCC
Asn	AAT.

As far as GCT is concerned, the possibility is taken into account that the triplet CGG which is complementary to GCC (Ala) may be effective by formation of a G-T bridge; as for TCG (Ser) and AAT (Asn), the same observation holds true for AGT and TTG, respectively.

ACG, GCG and TCG are very rare codons (CG rule) and were therefore not taken into account.

Example 4

Amplification of a partial sequence coding for TNF-BP from a cDNA library

a) Isolation of λ -DNA from a cDNA library

The cDNA library was made according to the method described in EP-A1-0293 567 for human placental cDNA library, except for the difference that 10^9 fibrosarcoma cells of the cell line HS 913 T which had been cultivated under stimulation with human TNF- α (10 ng/ml) were used as starting material. Instead of λ gt10 λ gt11 was used (cDNA synthesis: Amersham RPN 1256; EcoRI digested λ gt11 arms: Promega Biotech; in vitro packing of the ligated DNA: Gigapack Plus, Stratagene).



5 ml of the phage supernatant of the amplified cDNA library of the human fibrosarcoma cell line HS913T in λ gt11 were mixed with 0.5 μ g RNase A and 0.5 μ g DNase I and incubated at 37°C for one hour. The mixture was centrifuged at 5000xg for 10 min, the supernatant was freed by extraction with phenol and chloroform from protein, and the DNA was precipitated from the aqueous phase by addition of ethanol. The λ -DNA was dissolved in TE buffer (10 mM Tris pH = 7.5; 1 mM EDTA).

b) PCR amplification of a TNF-BP sequence from a cDNA library.

16 individual reactions in which one of the 4 mixed oligonucleotides EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641, EBI-1642 was respectively used as the first primer and one of the four mixed oligonucleotides EBI-1653, EBI-1654, EBI-1657, EBI-1658 as the second primer were carried out for the application of the PCR (26) to DNA of the HS913T cDNA library. Each of these mixed oligonucleotides contains 48 different oligonucleotides of the same length. Amplification by means of PCR took place in 50 μ l reaction volume containing 250 ng λ -DNA of the cDNA library, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH=8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatine, 0.2 mM of each of the 4 deoxynucleoside triphosphate(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), each 200 pmole first and second primers, 1.25 units Taq polymerase [Perkin Elmer Cetus]. To avoid evaporation, the solution was overlayed with a few drops of mineral oil (0.1 ml). The PCR was carried out in a DNA Thermal Cyclor (Perkin Elmer Cetus) as follows: The samples were heated to 94°C for 5 minutes to denature the DNA and subsequently



subjected to 40 amplification cycles. One cycle consisted of a 40-second incubation at 94°C, a 2-minute incubation at 55°C and a 3-minute incubation at 72°C. At the end of the last cycle the samples were incubated at 72°C for another 7 minutes to ensure that the last primer extension is complete. After cooling to room temperature the samples were freed from protein with phenol and chloroform and the DNA was precipitated with ethanol.

5 µl of each of the 16 PCR samples were applied to an agarose gel and the length of the amplified DNA fragments was determined after electrophoretic separation. The strongest DNA band, a fragment of 0.16 kb length, could be seen in the PCR samples which had been amplified with the oligonucleotide EBI-1653 as the first primer and one of the oligonucleotides EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641 or EBI-1642 as the second primer. Since the sample amplified with the primer pair EBI-1653 and EBI-1642 contained the largest amount of said 0.16 kb DNA fragment, this sample was selected for further processing.

Example 5:

Cloning and sequencing of a DNA fragment obtained by PCR amplification.

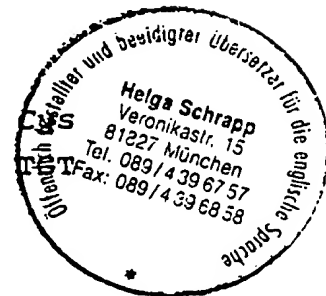
The resultant PCR product of the primers EBI-1642 and EBI-1653 was cut with BamHI and subsequently separated electrophoretically in an agarose gel (1.5% NuSieve GTG Agarose plus 1% Seakem GTG Agarose, FMC Corporation) according to size. The main band, a DNA fragment of 0.16 kb length, was electroeluted from the gel and



precipitated with ethanol. This DNA fragment was ligated with BamHI/SmaI cut plasmid pUC18 (Pharmacia) and E. coli JM101 transformed with the ligation mixture. The plasmids prepared according to the minipreparation method were characterized by cutting with the restriction enzymes PvuII and EcoRI-BamHI and subsequent electrophoresis in agarose gels. The plasmid pUC18 contains two sites for PvuII which flank the polyconing site in a 0.32 kb DNA fragment. Very short DNA inserts at the polycloning site of the plasmid can be visualized more easily in the agarose gel after cutting with PvuII because the length increases by 0.32 kb. The DNA fragment ligated in the plasmid vector cut with BamHI and SmaI, including a few base pairs of the polylinker sequence, can be obtained by cutting with EcoRI and BamHI. A clone with the desired insert was designated as pTNF-BP3B. After subcloning of an EcoRI-BamHI fragment the whole DNA insert of this clone was sequenced in M13mp18 (Pharmacia) after the modified dideoxy method with Sequenase (United States Biochemical Corporation).

An analysis of the DNA amplified by PCR showed the following sequence (only the non-coding strand is shown,

	5		10	
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys				
CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC				
	15		20	
Cys Thr Lys Cys His Lys <u>Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp</u>				
TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC				
	30		35	
<u>Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr</u> Asp Cys Arg Glu				
TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG				
	40		45	
Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn Asn Lys				
GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG GAT CC				
			50	



The first 20 and the last 29 nucleotides (in italics) correspond to the sequences of the primer oligonucleotides EBI-1642 and the complement of EBI-1653. The amino acids 38 to 43 confirm the remaining sequence of the tryptic peptide 11.

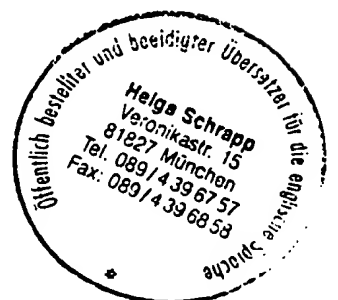
Furthermore, the DNA fragment produced by means of PCR contains the sequence of the peptide of fraction 20 of the tryptic digest (amino acids 20 to 34, underlined). Hence, this demonstrates that the clone pTNF-BP3B was derived from a cDNA which codes for TNF binding protein. pTNF-BP3B thus represents a probe, for instance for searching cDNA libraries for TNF-BP cDNAs.

Example 6:

Isolation of TNF-BP cDNA clones

About 720,000 phages of the HS913T cDNA library in λ gt11 were plated on E.coli Y1088 (lacU169, pro::TN5, tonA2, hsdR, supE, supF, metB, trpR, F⁻, λ ⁻, (pMC9)) (about 60,000 phages per 14.5 cm Petri dish, LB agar: 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl, 1.5% agar, plating in top agarose: 10 g/l tryptone, 8 g/l NaCl, 0.8% agarose). Two nitrocellulose filter lifts were made from each plate. The filters were prewashed (at 65°C for 16 hours) in:

50 mM	Tris/HCl	pH=8.0
1 M	NaCl	
1 mM	EDTA	



0.1% SDS

The filters were prehybridized at 65°C for two hours in:

- 6x SSC (0.9 M NaCl, 0.09 M tri-Na-citrate)
- 5x Denhardt's (0.1% ficoll, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% BSA (= bovine serum albumin))
- 0.1% SDS

Preparation of the radioactively labeled probe:
pTNF-BP 3B was cut twice with BamHI and EcoRI and the insert of about 0.16 kb was isolated. 0.6 µg of the insert in 32 ml was denatured at 100°C and primed with 60 pmole of EBI-1642 and EBI-1653 each by cooling to 80°C for 10 minutes and sudden cooling in iced water. After addition of

- 10 µl α -³²P-dCTP (100 µCi, 3.7 MBq)
- 5 µl 10x priming buffer (0.1 M Tris/HCl pH=8.0, 50 mM MgCl₂)
- 2 µl 1mM dATP, dGTP, dTTP each
- 1 µl PolIK (Klenow fragment of the E.coli DNA polymerase I, 5 units)

incubation was carried out at room temperature for 90 minutes. After heat inactivation (to 70°C for 10 minutes) the non-incorporated radioactivity was separated by chromatography via Biogel P6DG (Biorad) in TE buffer (10 mM Tris/HCl pH=8, 1 mM EDTA). 65x10⁶ cpm were incorporated.



The filters were hybridized in a total volume of 80 ml 6xSSC/5X Denhardt's/9.1% SDS plus heat-denatured hybridizing probe at 65°C for 16 hours.

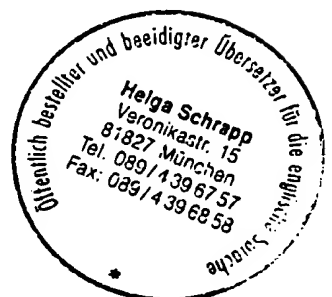
The filters were washed twice in 6xSSC/0.01% SDS at room temperature for 30 minutes and once in 2xSSC/0.01% SDS at room temperature for 45 minutes and three times in 2xSSC/0.01% SDS at 65°C for 30 minutes. The filters were air-dried and subsequently exposed at -70°C on Amersham Hyperfilm for 16 hours using an intensifying screen. A total of 30 hybridizing plaques were identified (λ -TNF-BP #1-30).

The regions with the hybridizing plaques were cut out as precisely as possible, and the phages were eluted in 300 μ l SM buffer plus 30 μ l chloroform.

In the end 25 hybridizing phages were isolated (λ -TNF-BP #1-10, 12-24, 29, 30) by "plaque purification" (plating of about 200 phages per 9 cm Petri dish during the second pass and about 20 phages per 9 cm Petri dish during the third pass, filter lifts twice, preparation, hybridization and washing as described during the first screening).

Representation of the recombinant λ -DNA from the clones λ -TNF-BP #13, 15, 23, 30:

2×10^6 phages were plated on E.coli Y1088 in top agarose (10 g/l tryptone, 8 g/l NaCl, 0.8% agarose) (14.5 cm Petri dish with LB agarose (1.5% agarose, 0.2% glucose, 10 mM MgSO_4 , 10 g/l tryptone, 5 g/l, yeast extract, 5 g/l NaCl) and incubated at 37°C for 6 hours. After cooling of the plates (at 4°C for 30 minutes) 10 ml λ -diluent (10 mM Tris/HCl pH=8.0, 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM ETA) were overlayed



and elution was carried out at 4°C for 16 hours. The supernatant was transferred into 15 ml Corex tubes and centrifuged at 15000 rpm and 4°C for 10 minutes (Beckman J2-21 centrifuge, JA20 Rotor). The supernatant was decanted in 10 ml polycarbonate tubes and centrifuged at 50000 rpm, 20°C up to $\omega^2 t = 3 \times 10^{10}$ (Beckmann L8-70, 50 Ti Rotor). The pellet was resuspended in 0.5 ml λ -diluent and transferred in Eppendorf tubes (1.4 ml). After addition of 5 μ g RNase A and 0.5 μ g DNaseI and incubation at 37°C for 30 minutes and addition of 25 ml 0.5 M EDTA, 12.5 ml 1 M Tris/HCl pH=8.0, 6.5 ml 20% SDS there was another incubation at 70°C for 30 minutes. The λ -DNA was purified by phenol/chloroform extraction and precipitated with ethanol. Finally the DNA was dissolved in 100 ml TE buffer.

Example 7:

Subcloning and sequencing of TNF-BP cDNA clones 15 and 23

To specify the cDNAs of the clones λ TNF-BP15 and λ TNF-BP23, which had shown the strongest signals during hybridization, the cDNA inserts were cut out with EcoRI from the λ -DNA, eluted from an agarose gel after electrophoretic separation and precipitated with ethanol. The DNA fragments of 1.3 kb (of λ TNF-BP15) and 1.1 kb (of λ TNF-BP23) were cut with EcoRI and ligated with alkaline phosphatase of calf intestine-dephosphorylated plasmid vector pT7/T3 α -18 (Bethesda Research Laboratories) with T4 DNA ligase and E.coli JM101-transformed. From individual bacterial colonies which



showed no blueness after selection on agarose plates with ampicillin and X-gal, plasmid DNA was made in the minipreparation method and the presence and orientation of the cDNA insert were determined by cutting with EcoRI and HindIII. Plasmids which contained the EcoRI insert of the phages λ TNF-BP15 and λ TNF-BP23 oriented in such a manner that the end corresponding to the 5' end of the mRNA faced the T7 promoter were named pTNF-BP15 and pTNF-BP23 respectively. The EcoRI inserts of λ TNF-BP15 and λ TNF-BP23 were also ligated in M13mp19 vector, which had been cut with EcoRI and dephosphorylated, and E.coli JM101 transformed. Single-strand DNA was prepared from some randomly selected M13 clones and used as a template for the sequencing according to the dideoxy method. On M13 clones which contained the cDNA inserts in the opposite orientation, both DNA strands were completely sequenced with the universal sequencing primer and with specifically synthesized oligonucleotide primers binding to the cDNA insert.

The complete nucleotide sequence of 1334 bases of the cDNA insert of λ TNF-BP15 and pTNF-BP15 is illustrated in Fig. 1. The bases 1-6 and 1328-1334 correspond to the EcoRI linkers which had been added to the cDNA during the preparation of the cDNA library. The nucleotide sequence of the cDNA insert of λ TNF-BP23 corresponds to that of λ TNF-BP15 (bases 22-1100), flanked by EcoRI linkers.



Literatur

1. Carswell, E.A., et al., 1975. ,
Proc.Natl.Acad.Sci.
USA. 25:3666-3670
2. Old, L.J. 1987. Nature (Lond.) 326:330-331
3. Aggarwal, B.B., et al.et al. 1985. Nature 318:
665-667
4. Gullberg, U., et al. et al. 1987. Eur. J.
Haematol. 39:241-251
5. Beutler, B., et al. et al. 1985.
Nature 316: 552 - 554.
6. Torti, F.M. et al. 1985.
Nature (Lond.) 229:867-869
7. Mahoney Jr., J.R., et al. 1985.
J. Immunol. 134:1673-1675.
8. Shalaby, M.R., et al. 1985.
J. Immunol. 135:2069-2073.
9. Klebanoff, S.J., et al. 1986.
J. Immunol. 136:4220-4225.
10. Mestan, J., et al. 1986.
Nature (Lond.) 323:816-819.
11. Wong, G.H.W., et al. 1986.
Nature (Lond.) 323:819-822.
12. Cerami, A., et al. 1988.
Immunol. Today 9:28-31.
13. Tracey, K.J., et al.1986.
Science (Wash.D.C.) 234:470-474.
14. Tracey, K.J., et al. 1987.
Nature (Lond.) 330:662-666.
15. Piguet, P.F., et al. 1987.
Immunobiol. 175:27
16. Waage, A., et al. 1987. Lancet. ii: 355-357.
17. Seckinger, P., et al. J 1987. J. Immunol. 139:
1546-1549.



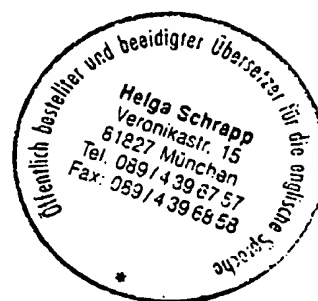
18. Beutler B., et al. 1988. A common mediator. Ann. Rev. Biochem. 57:505-18
19. Oliff A., et al. 1987. Cell 555-63.
20. Seckinger P., et al. 1988. J. Exp. Med. :1511-16
21. Olsson I., et al. 1988.
Eur.J. Haematol. 41: 414 - 420
22. Olsson I., et al. 1989.
Eur.J. Haematol. 42: 270 - 275
23. Creasey, A.A., et al. 1987.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol 84,: 3293-3297
24. Laemmli U.K. . 1970. Nature (London) 227:680-4.
25. Oakley, B.R., et al. 1986. 105:361-363.
26. Saiki, R.K., 1988. Science 239: 487-491
27. Staden, R., 1982. .
Nucleic Acid Res. 10 : 4731-4751
28. Pieler Ch., 1987 Dissertation, Universität Wien
29. Maniatis, T., et al. 1982.
Molecular Cloning A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory: 474
30. Sanger et al. 1977.
Proc.Natl.Acad.Sci. 74 :5463-5467
31. Hsieng, S.L., et al. 1988. J. Chromatography 447: 351-364
32. Stauber, G.B., et al. 1988. J.Biolog.Chem. 35, Vol.263: 19098-19104
33. Aggarwal, B.B., et al. 1985. Nature 318: 655-667
34. Locksley, R.M., et al. 1987. J.Imunol. 139: 1891-1895
35. Stauber, G.B., et al. 1989. J.Biolog.Chem. 6, Vol.264: 3573-3576
36. Frohman, M.A., et al. 1988.Proc.Natl.Acad.Sci. USA Vol 85: 8998-9002



Patent Claims

1. DNA coding for a polypeptide having the ability to bind TNF, or for a polypeptide of which said TNF-binding protein represents a partial sequence.
2. DNA according to claim 1, coding for a TNF-binding protein, characterized in that it has the formula

R² GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC
 CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC
 AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG
 GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC
 TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC
 CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG
 GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC CGG GAC ACC
 GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT
 TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC
 CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG
 GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT
 TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC TCC TGT AGT
 AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC
 CTA CCC CAG ATT GAG AAT



wherein R^2 is optionally absent or represents DNA coding for a (poly)peptide which can be cleaved in vivo, including degenerate variants thereof.

3. DNA according to claim 2, coding for secretable TNF-binding protein, characterized in that it has the formula defined in claim 2, wherein R^2 represents DNA which codes entirely or partly for a signal sequence.
4. DNA according to claim 2, characterized in that R^2 has the formula CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA.
5. DNA according to claim 3, characterized in that R^2 represents R^3 CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA, wherein R^3 represents DNA coding for a signal peptide.
6. DNA according to claim 5, characterized in that R^3 represents
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA
CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC
TCA GGG GTT ATT GGA.
7. DNA according to claim 1, coding for a TNF receptor or a segment thereof, characterized in that it has the formula



ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA
 CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC
 TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC
 AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA
 TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
 AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT
 CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
 GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC
 AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA
 ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC
 CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC
 AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC
 TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC
 CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG
 AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC
 ACT GAG GAC TCA GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG
 GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA TCC CTC CTC
 TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA
 CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT ACT
 AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT
 CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG
 CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA
 GAG GTG GCA CCA CCC TAT CAG GGG GCT GAC CCC ATC
 CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC CCC AAC
 CCC CTT CAG AAG TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA
 CAG AGC CTA GAC ACT GAT GAC CCC GCG ACG CTG TAC
 GCC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC TGG R¹



wherein R¹ represents a DNA segment which codes for the C-terminal region of the cytoplasmatic domain of the TNF receptor, or that it represents the segment coding for the corresponding receptor segment, including the degenerate variants thereof.

8. Nucleic acid, characterized in that it hybridizes with the DNA defined in claim 7 under conditions of low stringency.
9. Recombinant DNA molecule, characterized in that it contains at least a DNA defined in one of claims 1 to 6.
10. Recombinant DNA molecule, characterized in that it contains at least one DNA defined in claim 1 or 7.
11. Recombinant DNA molecule according to claim 9, which is replicable in prokaryotic or eukaryotic host organisms, characterized in that it contains expression control sequences functionally linked to the DNA defined in one of claims 1 to 6.
12. Recombinant DNA molecule according to claim 10, which is replicable in eukaryotic host organisms, characterized in that it contains expression control sequences functionally connected to the DNA defined in one of claims 1 to 7.



13. Host organism, characterized in that it is transformed with at least one recombinant DNA molecule according to claim 11.
14. Host organism, characterized in that it is transformed with at least one recombinant DNA molecule according to claim 12.
15. Host organism according to claim 14, characterized in that it is a mammalian cell.
16. Use of the host organism according to claim 15 for assaying substances as to their impact on the biological activity of TNF- α and/or TNF- β .
17. Polypeptide, characterized in that it is encoded by a DNA defined in one of claims 1 to 6.
18. Polypeptide, characterized in that it is encoded by a DNA defined in one of claims 1 to 7.
19. Use of polypeptides according to claim 17 and 18 for assaying substances for their interaction with TNF- α and/or with TNF- β or the receptor thereof and/or their impact on the biological activity thereof.
20. Method for producing a polypeptide according to claim 17, characterized in that a suitable host organism is transformed with recombinant DNA according to claim 11 and is grown, and that the protein expressed is isolated.



21. Method for producing a polypeptide according to claim 17, characterized in that a suitable host organism is transformed with recombinant DNA according to claim 12 and is grown, and that the expressed protein is isolated.
22. Polypeptide according to claim 17 for the prophylactic or therapeutic treatment of the human or animal body at indications involving a detrimental effect of TNF.
23. Polypeptide according to claim 17 for the treatment of inflammatory diseases.
24. Polypeptide according to claim 17 for the treatment of infectious diseases.
25. Polypeptide according to claim 17 for the treatment of parasitary diseases.
26. Polypeptide according to claim 17 for the treatment of shocks.
27. Polypeptide according to claim 17 for the treatment of pathological states occurring as side effects in the treatment with TNF- α .
28. Polypeptide according to claim 17 as a diagnostic agent for the detection of TNF- α and/or TNF- β .
29. Pharmaceutical preparations containing an amount of



a polypeptide of claim 17 which is effective to inhibit the biological activity of TNF- α .

30. Pharmaceutical preparations containing an amount of a polypeptide of claim 1 which is effective to inhibit the biological activity of TNF- β .



Abstract

On the basis of a purified protein which binds TNF- α , the DNA coding for said protein is provided. Said protein represents the extracellular part of a TNF receptor. Based on the DNA coding for the TNF-binding protein and a TNF-receptor, expression systems can be used for preparing recombinant TNF-binding protein and TNF receptor. Recombinant TNF-binding protein is used in pharmaceutical preparations for treating indications involving a detrimental effect of TNF. With the aid of the TNF receptor or fragments thereof, substances can e.g. be analyzed as to their impact on the biological action of TNF- α and/or TNF- β .





Fig. 1/1

GAATTCTCTGGACTGAGGCTCCAGTTCTGGCCTTTGGGG

TTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCCGAGTCTCAACCCCTCAACTGTC
ACCCCAAGGCACTTGGGACGTCTTGACAGACCGAGTCCCGGGAAGCCCCAGCACTGCC

GCTGCCACACTGCCCTGAGCCCCAAATGGGGGAGTGAGAGGCCA TAG CTG TCT GGC ***

S1 S5 S10 S15
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC
216 225 234 243 252

S20 S25 S29 1
Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu
CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG
261 270 279 288 297

5 10 15
Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro
GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC
306 315 324 333 342

20 25 30
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr
CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
351 360 369 378 387

35 40 45
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro
AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG
396 405 414 423 432

50 55 60
Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr
GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC
441 450 459 468 477

65 70 75
Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys
GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC
486 495 504 513 522

80 85 90
Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
531 540 549 558 567

95 100 105
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr
CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT
576 585 594 603 612

110 115 120
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu
TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC
621 630 639 648 657



Fig. 1/2

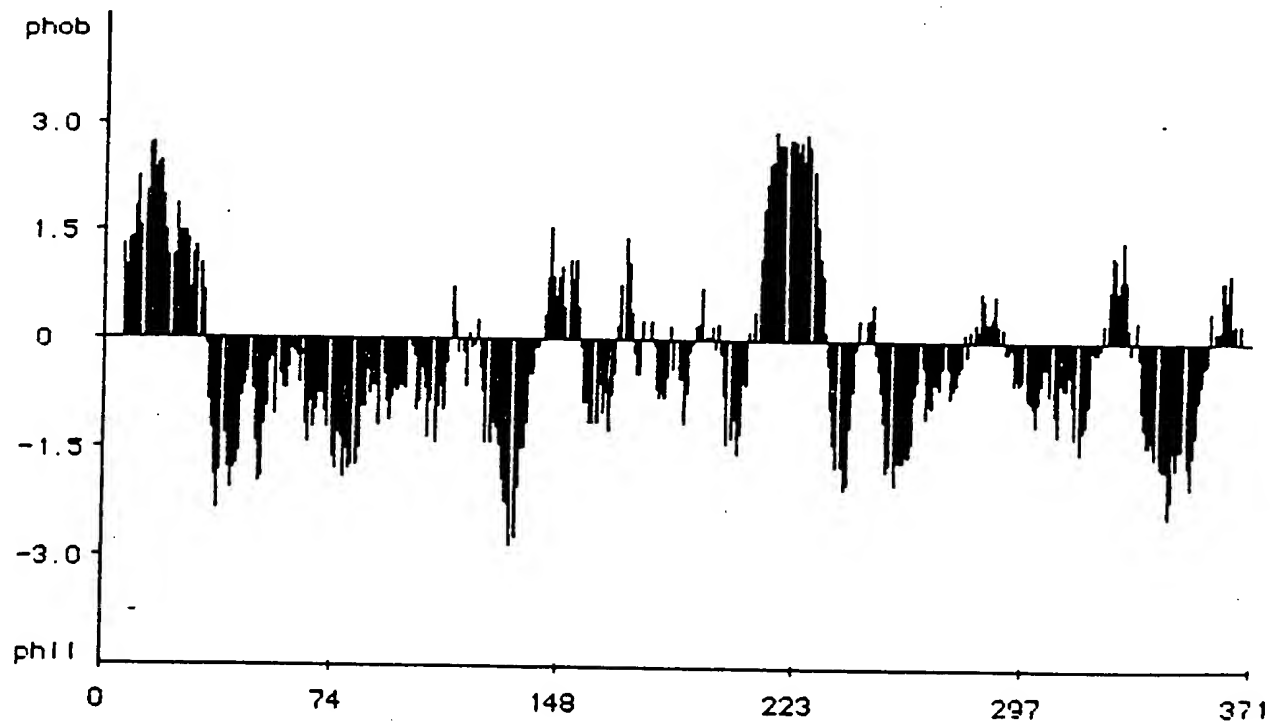
125	Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys	130	Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val
666	AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC	684	CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG
675		693	
702			
140	Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe	145	Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val
711	TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT	729	CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
720		738	
747			
155	Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser	160	Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys
756	TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC	774	CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC
765		783	
792			
170	Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys	175	Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr
801	CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG	819	GGC ACT GAG GAC TCA GGC ACC
810		828	
837			
185	Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile	190	Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu
846	ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT	864	TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA
855		873	
882			
200	Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met	205	Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
891	TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG	909	TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
900		918	
927			
215	Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys	220	Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys
936	TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT	954	GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA
945		963	
972			
230	Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr	235	Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn
981	GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT	999	ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC
990		1008	
1017			
245	Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly	250	Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe
1026	CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC	1044	TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC
1035		1053	
1062			
260	Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe	265	Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr
1071	AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC	1089	ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
1080		1098	
1107			
275	Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala	280	Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala
1116	CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG	1134	GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA
1125		1143	
1152			

Fig. 1/3

Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala
CCA	CCC	TAT	CAG	GGG	GCT	GAC	CCC	ATC	CTT	GCG	ACA	GCC	CTC	GCC
1161			1170			1179			1188			1197		
			305					310					315	
Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala
TCC	GAC	CCC	ATC	CCC	AAC	CCC	CTT	CAG	AAG	TGG	GAG	GAC	AGC	GCC
1206			1215			1224			1233			1242		
			320					325					330	
His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr
CAC	AAG	CCA	CAG	AGC	CTA	GAC	ACT	GAT	GAC	CCC	GCG	ACG	CTG	TAC
1251			1260			1269			1278			1287		
			335					340						
Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Trp				
GCC	GTG	GTG	GAG	AAC	GTG	CCC	CCG	TTG	CGC	TGG	AA	GGAATTC		
1296			1305			1314			1323			1332		



Fig. 2



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3920282 A1

⑰ Aktenzeichen: P 39 20 282.8
⑱ Anmeldetag: 21. 6. 89
⑲ Offenlegungstag: 3. 1. 91

⑤ Int. Cl. 5:
C12N 5/10
C 12 N 1/20
C 12 N 1/14
C 12 P 21/00
C 07 H 21/04
C 12 P 19/34
C 12 N 15/09
A 61 K 37/02
// C07K 3/14, 3/20,
3/22, 3/28

DE 3920282 A1

⑦ Anmelder:

Boehringer Ingelheim International GmbH, 6507
Ingelheim, DE

⑦ Erfinder:

Hauptmann, Rudolf, Dr., Ebreichsdorf, AT; Himmler,
Adolf, Dr.; Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.; Stratowa,
Christian, Dr., Wien, AT

⑭ TNF-Rezeptor, TNF bindende Proteine und dafür kodierende DNAs

Ausgehend von einem gereinigten TNF- α bindenden Protein wird die für dieses Protein kodierende DNA zur Verfügung gestellt. Dieses Protein stellt den extrazellulären Teil eines TNF-Rezeptors dar. Auf Basis der für das TNF-bindende Protein und einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA können Expressionssysteme zur Herstellung von rekombinantem TNF-bindenden Protein und TNF-Rezeptor verwendet werden. Rekombinantes TNF bindendes Protein kommt in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt, zur Anwendung.

Mit Hilfe des TNF-Rezeptors bzw. Fragmenten davon können z. B. Substanzen auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β untersucht werden.

DE 3920282 A1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf einen TNF-Rezeptor sowie auf ein TNF bindendes Protein.

Tumornekrosefaktor (TNF- α) wurde erstmals im Serum von Mäusen und Kaninchen gefunden, die mit *Bacillus Calmette-Guerin* infiziert und denen Endotoxin injiziert worden war, und auf Grund seiner cytotoxischen und Antitumoreigenschaften erkannt (1). Er wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert. Zahlreiche Zelltypen, die Ziele für TNF sind, weisen Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität für dieses Polypeptid auf (2); es wurde angenommen, daß Lymphotoxin (TNF- β) an denselben Rezeptor bindet (3, 4). TNF- α ist identisch mit einem als Cachectin bezeichneten Faktor (5), der die Lipoproteinlipase unterdrückt und bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen zur Hypertriglyceridämie führt (6, 7). TNF- α dürfte an der Regulation des Wachstums sowie an der Differenzierung und Funktion von Zellen, die bei Entzündungen, Immunvorgängen und Hämatopoese eine Rolle spielen, beteiligt sein.

TNF kann auf den Wirtsorganismus durch Stimulation von Neutrophilen (8, 9) und Monocyten sowie durch Hemmung der Replikation von Viren (10, 11) eine positive Wirkung ausüben. Darüber hinaus aktiviert TNF- α die Immunabwehr gegen Parasiten und wirkt direkt und/oder indirekt als Mediator bei Immunreaktionen, entzündlichen Prozessen und anderen Vorgängen im Organismus, wobei die Wirkmechanismen in vielen Fällen noch ungeklärt sind.

Die Verabreichung von TNF- α (12) kann jedoch auch von schädlichen Erscheinungen (13) wie Schock und Gewebeschädigungen begleitet sein, die durch Antikörper gegen TNF- α aufgehoben werden können (14). Eine Reihe von Beobachtungen läßt auf eine Rolle von endogen freigesetztem TNF- α bei verschiedenen pathologischen Zuständen schließen. So scheint TNF- α ein Mediator der Kachexie zu sein, die bei chronisch-invasiven, z.B. parasitären Erkrankungen auftreten kann. TNF- α scheint auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des durch gram-negative Bakterien verursachten Schocks (Endotoxin-Schock) zu spielen; er dürfte an einigen, wenn nicht allen Wirkungen von Lipopolysacchariden beteiligt sein (18). Ebenso wurde eine Funktion von TNF bei den im Rahmen von entzündlichen Prozessen in Gelenken und anderen Geweben auftretenden Gewebeschädigungen sowie bei der Letalität und Morbidität der Graft-versus-host reaction (GVHR, Transplantat-Abstoßung) (15) postuliert. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF im Serum und dem tödlichen Ausgang von Meningokokken-erkrankungen berichtet (16).

Weiters wurde beobachtet, daß die Verabreichung von TNF- α über einen längeren Zeitraum einen Zustand von Anorexie und Auszehrung verursacht, die eine ähnliche Symptomatik aufweist wie die Kachexie, die mit neoplastischen und chronischen infektiösen Erkrankungen einhergeht (19).

Es wurde über eine TNF-inhibierende Aktivität eines Proteins aus dem Harn von Fieberpatienten berichtet, von dessen Wirkung vermutet wird, daß sie auf einen kompetitiven Mechanismus auf Rezeptorebene selbst (ähnlich der Wirkung des Interleukin-1 Inhibitors (17)) zurückzuführen ist (20).

In der EP-A 23 08 378 wird ein TNF-inhibierendes Protein beschrieben, das aus menschlichem Harn gewonnen wurde. Seine Wirkung wurde im Harn gesunder und kranker Personen nachgewiesen und aufgrund der Fähigkeit bestimmt, die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren auf humanen HeLa Zellen und FS 11 Fibroblasten sowie die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf murine A9 Zellen zu inhibieren. Das Protein wurde im wesentlichen zur Homogenität gereinigt und durch seinen N-Terminus charakterisiert. In dieser Patentveröffentlichung werden zwar grundsätzlich mögliche Wege dargelegt, zur für das Protein kodierenden DNA und zum rekombinanten Protein zu gelangen; es werden jedoch keine konkreten Angaben gemacht, welcher der theoretisch möglichen Lösungswege zum Ziel führt.

In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung konnte aus Dialyseharn von Urämiepatienten ebenfalls ein Protein identifiziert werden, das die biologischen Wirkungen von TNF- α hemmt, indem es durch Wechselwirkung mit TNF- α dessen Bindung an seinen Zelloberflächenrezeptor verhindert (21). Von diesem Protein wurde auch eine Affinität zu TNF- β festgestellt.

Die Anwesenheit dieses Proteins (im folgenden TNF-BP genannt) im konzentrierten Dialyseharn wurde durch Konkurrenz mit der Bindung von radioaktiv markiertem rekombinantem TNF- α an einen Subklon von HL-60 Zellen nachgewiesen, wobei der Einfluß von dialysiertem Harn auf die Bindung von 125 I-TNF- α an die Zellen gemessen wurde. Die durchgeführten Bindungsversuche zeigten eine dosisabhängige Hemmung der TNF- α -Bindung an die Zelle durch konzentrierten Dialyseharn (die Möglichkeit der Interpretation, daß die beobachtete Verringerung der Bindung durch gegebenenfalls im Harn vorhandenen TNF- α selbst oder TNF- β , der um die Bindung konkurriert, verursacht werden könnte, wurden durch den Befund, daß die Verringerung der Bindung durch Anwendung von TNF- α - und TNF- β -Antikörpern nicht aufgehoben werden konnte, ausgeschlossen).

In analoger Weise wurde in Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung nachgewiesen, daß TNF-BP auch Affinität zu TNF- β aufweist, sie beträgt ca. 1/50 seiner Affinität zu TNF- α .

Mittels Gelchromatographie auf Sephacryl 200 wurde festgestellt, daß eine Substanz im Harn und Serum von Dialysepatienten sowie im Serum von gesunden Personen mit rekombinantem TNF- α einen Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 75 000 bildet.

TNF-BP wurde aus mehreren Proben Dialyseharn von Urämiepatienten durch partielle Reinigung mittels Druckultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie 62fach angereichert.

Die erhaltenen Präparationen wurden zum Nachweis der biologischen Aktivität von TNF-BP durch Hemmung der wachstumshemmenden Wirkung von TNF- α auf HL-60-10 Zellen verwendet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von TNF-BP auf die biologische Wirkung von TNF- α . Es wurde weiters das Bindungsverhalten von Zellen durch Vorbehandlung mit TNF-BP und ausschließendem Kompetitionsbindungstest untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, daß Vorbehandlung der Zellen mit TNF-BP die Bindung von TNF- α an die Zelle nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, daß die Wirkung von TNF-BP nicht auf seiner etwaigen Bindung an die Zelle und Konkurrenzierung mit TNF- α um die Bindung an den Rezeptor beruht.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde in hochgereinigter Form erhalten, indem Harn von Dialysepatienten durch Ultrafiltration konzentriert, der konzentrierte Harn dialysiert und zunächst in einem ersten Reinigungsschritt mittels DEAE-Sephacel-Chromatographie auf das Vierfache angereichert wurde. Die weitere Anreicherung erfolgte mittels Affinitätschromatographie durch an Sepharose gebundenen TNF- α . Die Endreinigung wurde mittels Reverse Phase Chromatographie (FPLC) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß das im wesentlichen hochgereinigte Protein die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf WEHI 164 Klon 13 Zellen hemmt (22).

Vom im wesentlichen hochgereinigten Protein wurde die N-terminale Aminosäuresequenz aufgeklärt. Sie wurde mit Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-(Hauptsequenz) bestimmt (daneben wurde in Spuren die folgende N-terminale Sequenz nachgewiesen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-(Nebensequenz)). Der Vergleich der Hauptsequenz mit der N-terminalen Sequenz des in der EP-A2 3 08 378 geoffenbarten TNF-inhibierenden Proteins zeigt die Identität der beiden Proteine.

Es wurde folgende Aminosäurezusammensetzung, angegeben in Mol-Aminosäure pro Mol Protein und in Mol % Aminosäure, bestimmt als Mittelwert einer 24 und 48 stündigen Hydrolyse, ermittelt:

	Mol Aminosäure/ Mol Protein	Mol-% Aminosäure
Asp + Asn	27,5	10,9
Thr	15,8	6,3
Ser	20,7	8,2
Glu + Gln	35,0	13,8
Pro	9,5	3,8
Gly	16,0	6,3
Ala	4,2	1,7
Cys	32,3	12,8
Val	10,8	4,3
Met	1,1	0,4
Ile	7,0	2,8
Leu	20,2	8,0
Tyr	6,1	2,4
Phe	8,1	3,2
His	11,1	4,4
Lys	15,7	6,2
Arg	11,8	4,7
Total	252,9	100

Ein Gehalt an Glukosamin wurde mittels Aminosäureanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse eines mit Concanavalin A und Weizenkeimlektin durchgeführten Affinoblots zeigten ebenfalls, daß es sich bei TNF-BP um ein Glykoprotein handelt.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde tryptisch verdaut und von 17 der erhaltenen Spaltpeptide die Aminosäuresequenzen bestimmt. Weiters wurde der C-Terminus analysiert.

TNF-BP kommt offensichtlich die Funktion eines Regulators der TNF-Aktivität mit der Fähigkeit zu, die Konzentrationsänderungen von freiem, biologisch aktivem TNF- α abzuf puffern. TNF-BP dürfte auch die Ausscheidung von TNF durch die Niere beeinflussen, weil der mit TNF gebildete Komplex, dessen Molekulargewicht mittels Gelpermeationschromatographie auf Sephadex G 75 mit ca. 75 000, bestimmt wurde, im Gegensatz zu TNF offensichtlich nicht durch den Glomerulus zurückgehalten wird.

Das TNF-BP wurde aus dem Harn von Dialysepatienten als eine von drei Hauptproteinkomponenten, die Affinität zu TNF aufweisen und die gemeinsam mit TNF-BP von der TNF-Affinitätschromatographiesäule eluieren, nachgewiesen. Die beiden anderen Proteine binden jedoch offensichtlich in einer Weise, die die Bindung von TNF- α an seinen Zelloberflächenrezeptor nicht beeinträchtigt.

Die zur biologischen Wirkung des TNF-BP erhaltenen Ergebnisse, insbesondere der Vergleich der Bindungskonstante mit der für den TNF-Rezeptor beschriebenen Bindungskonstante (23) lieferten einen ersten Hinweis dafür, daß es sich bei diesem Protein um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handeln könnte.

Auf Grund seiner Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF- α und TNF- β zu inhibieren, ist das TNF-bindende Protein geeignet, bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine Herabsetzung der TNF-Aktivität im Organismus angezeigt ist. Geeignet zur Anwendung bei diesen Indikationen sind auch Derivate oder Fragmente des TNF-bindenden Proteins mit der Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF zu inhibieren.

TNF-BP (bzw. seine funktionellen Derivate oder aktiven Fragmente) kann zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt, eingesetzt werden. Zu diesen Erkrankungen zählen insbesondere entzündliche sowie infektiöse und parasitäre Erkrankungen oder Schockzustände, bei denen endogenes TNF- α freigesetzt wird, weiters Kachexie, GVHR und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, etc. Es sind darunter auch pathologische Zustände zu verstehen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α , besonders bei hoher Dosierung, auftreten können, z.B. schwere Hypotension oder Störungen des Zentralnervensystems.

Als Arzneimittel kommen insbesondere pharmazeutische Zubereitungen für die parenterale Anwendung in

Betracht, z.B. in Form von Lyophilisaten oder Lösungen, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen, wie Stabilisatoren. Auf Grund seiner TNF bindenden Eigenschaften ist TNF-BP auch als Diagnostikum für die Bestimmung von TNF- α und/oder TNF- β geeignet, z.B. als eine der Komponenten in Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays, gegebenenfalls zusammen mit Antikörpern gegen TNF.

5 Auf Grund seiner Eigenschaften ist dieses Protein ein pharmakologisch wertvoller Wirkstoff, der aus natürlichen Quellen nicht in ausreichender Menge mittels proteinchemischer Methoden darstellbar ist.

Es bestand daher das Bedürfnis, dieses Protein (bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden) auf rekombinantem Weg herzustellen, um es für die therapeutische Anwendung in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

10 Unter der "Fähigkeit, TNF zu binden" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Eigenschaft eines Proteins zu verstehen, an TNF- α derart zu binden, daß die Bindung von TNF- α an den funktionellen Teil des Rezeptors verhindert und die Wirkung von TNF- α im menschlichen oder tierischen Organismus gehemmt oder aufgehoben wird. Durch diese Definition ist die Fähigkeit eines Proteins, auch an andere Proteine, z.B. an TNF- β , binden und deren Wirkung inhibieren zu können, mit eingeschlossen.

15 Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die für TNF-BP kodierende DNA zur Verfügung zu stellen, um auf deren Basis die Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle zu ermöglichen, mit denen geeignete Wirtsorganismen transformiert werden können, um TNF-BP bzw. funktionelle Derivate und Fragmente davon zu produzieren.

Im Rahmen dieser Aufgabenstellung sollte auch festgestellt werden, ob es sich beim TNF-BP um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handelt, um ausgehend davon die Grundlage für die Aufklärung der Rezeptorsequenz zu schaffen und einen rekombinanten TNF-Rezeptor bereitzustellen.

Das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors mit hoher Affinität zu TNF- α auf verschiedenen Zelltypen wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. Kürzlich wurde erstmals von der Isolierung und vorläufigen Charakterisierung eines TNF- α Rezeptors berichtet (32). Da die Bindung von radioaktiv markiertem TNF- α durch einen Überschuß an TNF- β aufgehoben werden kann (33), wurde vorgeschlagen, daß TNF- α und TNF- β einen gemeinsamen Rezeptor teilen. Da jedoch andererseits gezeigt werden konnte, daß bestimmte Zelltypen, die auf TNF- α ansprechen, gegen TNF- β teilweise oder gänzlich unempfindlich sind (34), wurde die Existenz eines gemeinsamen Rezeptors wieder in Zweifel gezogen. Im Gegensatz dazu scheinen kürzlich erhaltene Ergebnisse zu den Bindungseigenschaften von TNF- β an Rezeptoren die Theorie eines gemeinsamen Rezeptors wieder zu erhärten (35), wobei in dieser Arbeit vorgeschlagen wird, daß zwischen TNF- α und TNF- β Unterschiede hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Rezeptor bzw. zusätzlich hinsichtlich der in der Zelle nach der Ligand-Rezeptorwechselwirkung eintretenden Ereignisse bestehen.

Die Verfügbarkeit der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem Rezeptor und damit u.a. eine wesentliche Erleichterung für die Durchführung vergleichender Untersuchungen verschiedener Zelltypen auf ihre(n) TNF- α - und/oder TNF- β - Rezeptor(en) bzw. auf die durch die Bindung von TNF an den Rezeptor in der Zelle ausgelösten Reaktionen dar. Dadurch wird weiters die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors ermöglicht und damit die Voraussetzung für ein rationales Design für die Entwicklung von Agonisten und Antagonisten der TNF-Wirkung geschaffen.

Das Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Hybridisierungssonden, die von Aminosäuresequenzen kurzer Peptide abgeleitet sind, stößt auf Grund der Degeneration des genetischen Codes mitunter auf größere Schwierigkeiten. Zusätzlich erschwert wird diese Vorgangsweise dann, wenn von einem Protein, wie z.B. dem TNF-BP, nicht bekannt ist, in welchen Geweben es synthetisiert wird. In diesem Fall kann bei einem Versagen dieser Methode unter Umständen nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden, ob es auf die Wahl einer ungeeigneten cDNA-Bibliothek oder auf die zu geringe Spezifität der Hybridisierungssonden zurückzuführen ist.

45 Zur Lösung der gestellten Aufgabe wurde daher erfindungsgemäß wie folgt vorgegangen: Als cDNA-Bibliothek wurde eine Bibliothek der Fibrosarkomzelllinie HS913 T, die mit TNF α induziert worden war und in Lambda gt11 vorlag, eingesetzt. Um aus dieser Bibliothek Lambda DNA mit TNF-BP Sequenzen zu erhalten, wurde die große Empfindlichkeit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, (26)) ausgenutzt. (Mit Hilfe dieser Methode kann aus einer gesamten cDNA-Bibliothek eine unbekannte DNA-Sequenz erhalten werden, die flankiert ist von Oligonukleotiden, die auf Basis bekannter Aminosäureteilsequenzen entworfen und als Primer eingesetzt wurden. Ein solches längeres DNA-Fragment kann nachfolgend als Hybridisierungssonde, z.B. zur Isolierung von cDNA-Klonen, insbesondere des ursprünglichen cDNA-Klons, eingesetzt werden).

50 Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß auf Basis der N-terminalen Aminosäuresequenz (Hauptsequenz) und Aminosäuresequenzen von tryptischen Peptiden, die vom hochgereinigten TNF-BP erhalten worden waren, Hybridisierungssonden hergestellt wurden und mit Hilfe dieser Sonden zunächst mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek HS913T eine cDNA, die einen Teil der für TNF-BP kodierenden cDNA darstellt, erhalten wurde. Diese cDNA weist die folgende Nukleotidsequenz auf:

60 CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC
TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC
TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
65 GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG .

Diese DNA stellt eine von möglichen Varianten dar, die geeignet sind, mit TNF-BP-DNAs bzw. TNF-BP-RNAs zu hybridisieren (solche Varianten umfassen z.B. diejenigen DNA-Moleküle, die durch PCR-Amplifikation mit Hilfe von Primern erhalten werden, deren Nukleotidsequenz nicht exakt mit der gesuchten Sequenz übereinstimmt, etwa aufgrund von zu Klonierungszwecken vorgesehenen Restriktionsschnittstellen oder aufgrund von bei der Aminosäuresequenzanalyse etwa nicht eindeutig ermittelten Aminosäuren).

Unter "TNF-BP-DNAs" bzw. "TNF-BP-RNAs" sind Nukleinsäuren zu verstehen, die für TNF-BP bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden kodieren bzw. die für ein solches Protein kodierende Sequenz enthalten.

Unter TNF-BP-DNAs (bzw. TNF-BP-RNAs) sind auch cDNAs, abgeleitet von mRNAs, die durch alternatives Splicing entstanden sind (bzw. diese mRNAs selbst), mitumfaßt. Unter "alternativem Splicing" wird die Entfernung von Introns verstanden, bei der vom gleichen mRNA-Precursor verschiedene Spliceacceptor- und/oder Splicedonorstellen verwendet werden. Die dabei entstehenden mRNAs unterscheiden sich voneinander durch das gänzliche oder teilweise Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Exonsequenzen, wobei es gegebenenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann.

Die zunächst erfindungsgemäß erhaltene, einen Teil der für TNF-BP kodierenden Sequenz enthaltende cDNA (bzw. Varianten davon) kann somit als Hybridisierungssonde verwendet werden, um aus cDNA-Bibliotheken cDNA-Klone, enthaltend TNF-BP-DNAs, zu erhalten. Weiters kann sie als Hybridisierungssonde für mRNA-Präparationen eingesetzt werden, um TNF-BP-RNAs zu isolieren und daraus z.B. angereicherte cDNA-Bibliotheken herzustellen, die ein wesentlich vereinfachtes und effizienteres Screening ermöglichen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Isolierung der gewünschten DNAs aus genomischen DNA-Bibliotheken mit Hilfe dieser DNAs als Hybridisierungssonden.

Da die oben definierte DNA (bzw. ihre Varianten) in der Lage ist, mit DNAs (bzw. RNAs) zu hybridisieren, die für TNF-BP kodieren bzw. die für TNF-BP kodierende Sequenz enthalten, können mit Hilfe dieser DNA als Sonde auch cDNAs erhalten werden, die für Proteine kodieren, deren Prozessierung TNF-BP ergibt. Unter Prozessierung ist die in vivo Abspaltung von Teilsequenzen zu verstehen. Dabei kann es sich N-terminal um die Signalsequenz und/oder andere Sequenzen und gegebenenfalls zusätzlich (falls sich die Annahme bestätigt, daß TNF-BP den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors darstellt) C-terminal um die transmembrane und zytoplasmatische Region des Rezeptors handeln. Mit Hilfe dieser Hybridisierungssonde ist es daher möglich, geeignete cDNA-Bibliotheken auf das Vorhandensein von cDNA, die die vollständige für einen TNF-Rezeptor kodierende Sequenz enthält, zu durchsuchen (dieser Vorgang kann erforderlichenfalls in mehreren Schritten erfolgen).

Erfindungsgemäß wurde die cDNA der oben definierten Sequenz, die mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek der TNF- α induzierten Fibrosarkomzelllinie HS913 T (in Lambda gt11), erhalten worden war, zum nochmaligen Durchsuchen der cDNA-Bibliothek verwendet, von den hybridisierenden Klonen die Lambda-DNA präpariert, subkloniert und sequenziert. Es wurde ein 1334 Basen langes cDNA Insert erhalten, das die für TNF-BP kodierende DNA enthält.

Die Erfindung betrifft eine DNA, kodierend für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, bzw. für ein Polypeptid, von dem dieses TNF bindende Protein eine Teilsequenz darstellt.

Darunter sind auch solche DNAs zu verstehen, die für Teile dieser Polypeptide kodieren.

Die vollständige Nukleotidsequenz des längsten erhaltenen cDNA-Inserts ist in Fig. 1 abgebildet.

Diese Nukleotidsequenz weist einen durchgehenden offenen Leserahmen auf, beginnend mit Base 213, bis zum Ende des 1334 bp langen cDNA Inserts. Da sich in demselben Leserahmen 4 Codons vor dem potentiellen Translationsstartcodon ATG (213-215) ein Stopcodon (TAG) befindet, kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei dem Startcodon tatsächlich um den in vivo verwendeten Translationsstart handelt.

Der Vergleich der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Aminosäuresequenzen, die vom aminoterminalen Ende von TNF-BP und von tryptischen Peptiden bestimmt worden waren, zeigt hohe Übereinstimmung. Daraus ergibt sich, daß die isolierte cDNA die für das authentische TNF-BP kodierende Sequenz enthält.

Vom N-Terminus ausgehend ist die erste Sequenz, die eine Übereinstimmung mit einer tryptischen Spaltpeptidsequenz zeigt, die Sequenz von Fraktion 12 (Leu-Val-Pro-), die auch als Nebensequenz bei der Analyse des N-Terminus von TNF-BP erhalten worden war. Dieses N-terminale Leucin entspricht der 30. Aminosäure in der cDNA Sequenz. Da der vorangehende Abschnitt von 29 Aminosäuren einen stark hydrophoben Charakter aufweist und es sich bei TNF-BP um ein sekretiertes Protein handelt, kann gefolgert werden, daß diese 29 Aminosäuren das für den Sekretionsvorgang benötigte Signalpeptid darstellen, das bei der Sekretion abgespalten wird (in Fig. 1 mit S1 - S29 bezeichnet).

Die als Hauptsequenz bei der N-terminalen Analyse von TNF-BP erhaltene Aminosäuresequenz entspricht den Aminosäuren beginnend mit Asp-12 in der cDNA Sequenz. Dieser Asparaginsäurerest folgt direkt dem basischen Dipeptid Lys-Arg. Da nach diesem Dipeptid in vivo sehr viele Proteine proteolytisch gespalten werden, ist anzunehmen, daß TNF-BP mit N-terminalem Asp nicht direkt durch Prozessierung eines Precursors beim Sekretionsvorgang entsteht, sondern daß vom prozessierten Protein die N-terminalen 11 Aminosäuren zu einem späteren Zeitpunkt durch extrazelluläre Proteasen abgespalten werden.

Das carboxy-terminale Ende von TNF-BP war mit Ile-Glu-Asn bestimmt worden (C-terminale Analyse; tryptisches Peptid Fraktion 27: Aminosäuren 159 - 172, tryptisches Peptid Fraktion 21: Aminosäuren 165 - 172), wobei Asn der Position 172 in der cDNA Sequenz entspricht.

Potentielle N-Glykosylierungsstellen der allgemeinen Formel Asn-X-Ser/Thr, wobei X jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann, befinden sich an den Positionen 25 - 27 (Asn-Asn-Ser), 116 - 118 (Asn-Cys-Ser) und 122 - 124 (Asn-Gly-Thr) der TNF-BP cDNA Sequenz. (Daß Asn-25 glykosyliert ist, ergibt sich daraus, daß bei der Sequenzierung des entsprechenden tryptischen Spaltpeptids an dieser Stelle Asn nicht identifiziert werden konnte.)

Die Analyse der Nukleotid — bzw. der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz im Zusammenhang mit den durchgeführten proteinchemischen Untersuchungen zeigt, daß es sich bei TNF-BP um ein glykosyliertes Polypeptid mit 172 Aminosäuren, das durch proteolytische Spaltung nach der 11. Aminosäure in ein Glykoprotein mit 161 Aminosäuren umgewandelt wird, handelt.

- 5 Die nachfolgende Tabelle zeigt die sequenzierten tryptischen Peptide und die aus der cDNA Sequenz abgeleiteten korrespondierenden Aminosäuresequenzen:

	Fraktion	Aminosäuren	
10	12	1 — 8	
	1	12 — 19	
	8	20 — 32	
	14/1	36 — 48	
15	20	36 — 53	
	11	54 — 67	(Aminosäuren 66 — 67 waren am Peptid nicht korrekt bestimmt worden)
	14/11	79 — 91	
	26	133 — 146	
20	5	147 — 158	
	27	159 — 172	

- Die erhaltene cDNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem TNF-BP dar.
 25 Gegenstand der Erfindung ist somit weiters die für, vorzugsweise sekretierbares, TNF-BP kodierende DNA.
 Durch Einbringen eines DNA-Konstruktes enthaltend die für TNF-BP kodierende Sequenz mit einer für ein Signalpeptid kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines geeigneten Promotors in geeignete Wirtsorganismen, zweckmäßigerweise in eukaryotische, bevorzugt höhere eukaryotische Zellen, kann TNF-BP produziert werden, das in den Zellüberstand sekretiert wird.

- 30 Im Falle der Verwendung eines Signalpeptids im Hinblick auf die Sekretion des Proteins wird zweckmäßigerweise die für das Signalpeptid kodierende DNA vor das Codon für Asp-12 gefügt, um ein einheitliches Produkt zu erhalten. Grundsätzlich ist jedes Signalpeptid geeignet, das im entsprechenden Wirtsorganismus die Sekretion des reifen Proteins gewährleistet. Gegebenenfalls kann die Signalsequenz auch vor das für Leu-1 kodierende Triplet gesetzt werden, wobei in diesem Fall erforderlich sein kann, die durch Abspaltung des aus 11 Aminosäuren bestehenden Peptids am N-Terminus entstehende Form von TNF-BP vom nicht oder nicht vollständig prozessierten TNF-BP in einem zusätzlichen Reinigungsschritt zu trennen.

- 35 Da die cDNA nach dem Codon für Asn-172, das aufgrund der C-terminalen Analyse den C-Terminus darstellt, kein Stopcodon enthält, wird zweckmäßigerweise im Hinblick auf die Expression von TNF-BP nach dem Codon für Asn 172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstopcodon eingeführt.

- 40 Die für TNF-BP kodierende DNA kann durch Mutation, Transposition, Deletion, Addition oder Verkürzung modifiziert werden, sofern derartig modifizierte DNAs für (Poly) peptide mit der Fähigkeit, TNF zu binden, kodieren. Derartige Modifikationen können z.B. darin bestehen, eine oder mehrere der potentiellen, gegebenenfalls für die biologische Aktivität nicht erforderlichen Glykosylierungsstellen zu verändern, indem z.B. das Asn-Codon durch ein für eine andere Aminosäure kodierendes Triplet ersetzt wird. Unter Berücksichtigung der 45 Erhaltung der biologischen Aktivität können auch Modifikationen vorgenommen werden, die in einer Änderung der Disulfidbrücken (z.B. Verringerung deren Anzahl) resultieren.

- Die angeführten DNA-Moleküle stellen somit die Voraussetzung für die Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle dar, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind. Mit solchen rekombinanten DNA-Molekülen in Form von Expressionsvektoren, enthaltend die für ein Protein mit TNF-BP Aktivität kodierende, gegebenenfalls 50 in geeigneter Weise modifizierte DNA, vorzugsweise mit einer vorgeschalteten Signalsequenz, und die für die Expression des Proteins erforderlichen Kontrollsequenzen, können geeignete Wirtsorganismen transformiert, gezüchtet und das Protein gewonnen werden.

- Ebenso wie etwaige Modifikationen der DNA-Sequenz erfolgt die Auswahl von für die Expression geeigneten Wirtsorganismen insbesondere im Hinblick auf die biologische Wirkung des Proteins, TNF zu binden. Darüber- 55 hinaus gehen die bei der Herstellung rekombinanter Proteine üblichen Kriterien wie Verträglichkeit mit dem gewählten Vektor, Prozessierungsfähigkeit, Isolierung des Proteins, Expressionscharakteristika, Sicherheits- und Kostenaspekte in die Entscheidung über den Wirtsorganismus ein. Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus dem für die Transformation vorgesehenen Wirt. Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, die die erfindungsgemäßen für TNF-BP kodierenden DNAs (bzw. Modifikationen davon) replizieren und exprimieren.

- 60 Im Hinblick auf die biologische Aktivität des Proteins ist bei der Expression der für TNF-BP kodierenden DNA vor allem der etwaigen Relevanz der beim natürlichen Protein festgestellten Kriterien Glykosylierung und hoher Anteil an Cysteinresten für die Eigenschaft, TNF zu binden, Rechnung zu tragen. Zweckmäßig werden daher für die Expression Eukaryonten insbesondere geeignete Expressionssysteme höherer Eukaryonten, verwendet.

- 65 Auf Grund ihrer Fähigkeit, TNF zu binden, sind die erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptide geeignet, bei der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt.

Da beim TNF-BP auch eine TNF- β inhibierende Wirkung nachgewiesen wurde, kann es (bzw. die verwandten

bzw. modifizierten Polypeptide) in geeigneter Dosierung, gegebenenfalls in im Hinblick auf eine gesteigerte Affinität zu TNF- β modifizierter Form, auch für die Inhibierung der Wirkung von TNF- β im Organismus verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β wirksam hemmende Menge von TNF-BP bzw. einem verwandten Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden.

Die cDNA enthält, wie bereits erwähnt, nach dem Codon für Asn-172 nicht das Stoppcodon, das aufgrund der Analyse des C-Terminus zu erwarten wäre, sondern der offene Leserahmen wird fortgesetzt. Die Region zwischen Val-183 und Met-204 hat einen stark hydrophoben Charakter. Dieser hydrophobe Bereich von 22 Aminosäuren, gefolgt von einem Abschnitt mit einem Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Arg-206, Arg-209) weist die typischen Merkmale einer Transmembrandomäne auf, die Proteine in der Zellmembran verankert. Der in Richtung C-Terminus folgende Proteinanteil ist dagegen wieder stark hydrophil.

Das Hydrophobizitätsprofil ist in Fig. 2 abgebildet (der Hydrophobizitätsplot wurde mit Hilfe des Mac Molly Programms (Fa. Soft Gene Berlin) erstellt; die Fensterweite für die Berechnung der Werte betrug 11 Aminosäuren. Hydrophobe Bereiche entsprechen positiven, hydrophile Bereiche negativen Werten auf der Ordinate. Auf der Abszisse ist die Zahl der Aminosäuren, beginnend mit dem Startmethionin S1, dargestellt).

Aus der Proteinstruktur ergibt sich, daß die für das lösliche, sekretierte TNF-BP kodierende DNA Teil einer für ein größeres Protein kodierenden DNA ist: Dieses Protein weist die Merkmale eines in der Zellmembran verankerten Proteins auf, enthält TNF-BP in für eine extrazelluläre Domäne typische Weise und weist einen beträchtlichen für zytoplasmatische Domänen typischen Abschnitt auf. Lösliches TNF-BP wird offensichtlich von dieser membrangebundenen Form durch proteolytische Spaltung knapp außerhalb der Transmembrandomäne erhalten.

Die Struktur des von der erhaltenen cDNA kodierten Proteins im Zusammenhang mit der Fähigkeit von TNF-BP, TNF zu binden, bestätigen die Annahme, daß es sich bei TNF-BP um einen Teil eines zellulären Oberflächenrezeptors für TNF handelt, dessen extrazelluläre, für die Bindung von TNF verantwortliche Domäne proteolytisch abgespalten werden kann und in Form des löslichen TNF-BP wiedergefunden wird. (Dabei soll nicht ausgeschlossen werden, daß im Hinblick auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors dieses Protein gegebenenfalls mit einem oder mehreren anderen Proteinen assoziiert ist.) (Für Zwecke der Produktion von TNF-BP in größerem Maßstab wird vorteilhafterweise nicht von der gesamten cDNA ausgegangen, weil das Erfordernis der Abspaltung von TNF-BP von dem Teil des Proteins, das den membrangebundenen Teil des TNF-Rezeptors darstellt, berücksichtigt werden mußte. Es wird vielmehr, wie bereits angeführt, zweckmäßigerweise nach dem Codon für Asn-172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstoppcodon eingeführt, um eine über das C-terminale Ende von TNF-BP hinausgehende Proteinsynthese zu verhindern.)

Mit der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA, die eine Teilsequenz der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA darstellt, gelangt man zur vollständigen Rezeptorsequenz, indem z.B. mittels modifizierter PCR (RACE = "rapid amplification of cDNA ends" (36)) das fehlende 3'-Ende mit Hilfe eines Primers, der aufgrund einer möglichst weit in Richtung 3'-Ende der vorhandenen cDNA gelegenen Sequenz konstruiert wurde, amplifiziert wird.

Eine alternative Methode besteht im konventionellen Screenen der cDNA-Bibliothek mit der verfügbaren cDNA bzw. Teilen davon als Sonde.

Gegenstand der Erfindung ist somit weiters die für einen TNF-Rezeptor kodierende DNA, die den in vivo translatierten Abschnitt der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA bzw. degenerierte Varianten davon enthält. Damit sind auch DNAs mitumfaßt, die für C- und/oder N-terminal verkürzte, z.B. prozessierte, oder für modifizierte (z.B. durch Änderungen an proteolytischen Spaltstellen, Glykosylierungsstellen oder bestimmten Domänenbereichen) Formen bzw. für Fragmente, z.B. die verschiedenen Domänen, des TNF-Rezeptors kodieren.

Diese DNAs können in Verbindung mit den für die Expression erforderlichen Kontrollsequenzen als Bestandteil rekombinanter DNA-Moleküle zur Transformation von prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen verwendet werden. Dadurch wird einerseits die Voraussetzung geschaffen, den TNF-Rezeptor in größeren Mengen auf rekombinantem Weg herzustellen, um z.B. die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur zu ermöglichen. Andererseits können mit diesen DNAs höhere eukaryotische Zellen transformiert werden, um Studien über Mechanismen und Dynamik der TNF/Rezeptor-Wechselwirkung, der Signalübertragung bzw. über die diesbezügliche Relevanz der verschiedenen Rezeptordomänen bzw. Abschnitten davon zu erhalten. Der rekombinante TNF-Rezeptor (bzw. Fragmente oder Modifikationen davon) kann dazu verwendet werden, Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit TNF oder den TNF-Rezeptor bzw. auf ihren Einfluß auf die durch TNF induzierte Signalübertragung zu untersuchen. Derartige Screenings (unter Verwendung der Proteine/Fragmente bzw. von entsprechend transformierten höheren eukaryotischen Zellen) schaffen die Voraussetzung für die Identifizierung von Substanzen, die TNF substituieren, seine Bindung an den Rezeptor hemmen bzw. solche, die den Mechanismus der durch TNF ausgelösten Signalübertragung blockieren oder verstärken können.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung mitumfaßt sind auch Nukleinsäuren, die nicht für TNF-BP oder den Rezeptor kodieren, die jedoch unter Bedingungen niedriger Stringenz mit der erfindungsgemäß erhaltenen cDNA hybridisieren.

Im einzelnen wurde die gestellte Aufgabe wie folgt gelöst:

Vom hochgereinigten TNF-BP wurden die N-terminale Aminosäuresequenz sowie die Aminosäuresequenzen von durch tryptischen Verdau des Proteins erhaltenen Peptiden bestimmt.

Weiters wurde der C-Terminus durch Carboxypeptidase P Verdau, Derivatisierung der abgespaltenen Aminosäuren und chromatographische Auftrennung bestimmt.

Aus den durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptidsequenzen wurden im Hinblick auf ihren Einsatz in der PCR für die Herstellung von Oligonukleotiden Bereiche einerseits aus dem N-Terminus und andererseits aus

5 einem tryptischen Peptid derart ausgewählt, daß die Komplexität von Mischoligonukleotiden für die Hybridisierung mit cDNA möglichst gering ist. Auf Basis dieser beiden Bereiche wurde je ein Satz Mischoligonukleotide hergestellt, wobei der vom N-terminal gelegenen Bereich abgeleitete entsprechen der mRNA und der vom tryptischen Peptid abgeleitete revers komplementär zur mRNA synthetisiert wurde. Um das nachfolgende

10 Klonieren eines mit PCR amplifizierten Segments zu erleichtern, wurde der vom tryptischen Peptid abgeleitete Satz von Oligonukleotiden mit einer BamHI-Restriktionsstelle versehen. Darauf wurde Lambda-DNA aus der TNF- α induzierten Fibrosarkom cDNA-Bibliothek isoliert und daraus eine TNF-BP-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert; es weist 158 Nukleotide auf und enthält

15 Peptid 20 kodierende Sequenz.

Dieses DNA-Fragment wurde nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde zur Isolierung von cDNA-Klonen aus der Fibrosarkom-Bibliothek verwendet. Es wurde dazu so verfahren, daß zunächst Plaques mit der Sonde hybridisiert, Phagen von hybridisierenden Plaques vereinzelt und daraus Lambda DNA gewonnen wurden. Einzelne cDNA-Klone wurden subkloniert und sequenziert; zwei der charakterisierten Klone enthielten die für TNF-BP kodierende Sequenz.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Vorversuche und Beispiele näher erläutert:

Vorversuch 1

Herstellung von hochgereinigtem TNF-BP

a) Konzentration des Harns

200 l Dialyseharn von Urämiepatienten, aufbewahrt in Flaschen enthaltend EDTA (10 g/l), Tris (6 g/l), NaN_3 (1 g/l) und Benzamidinhydrochlorid (1 g/l) sowie kühl gelagert, wurden durch Ultrafiltration mittels einem

25 hochdurchlässigen Hämokapillarfilter mit einer asymmetrischen Hohlfasermembran (FH 88H, Gambro) auf 42 l mit einem Proteingehalt von 567 g konzentriert. Der konzentrierte Harn wurde gegen 10 mM/l Tris HCl, pH 8 dialysiert. Während dieses Vorgangs wurde, wie in den nachfolgenden Schritten (außer bei der Reverse Phase Chromatographie), 1 mM/l Benzamidinhydrochlorid zugefügt, um proteolytischem Verdau entgegenzuwirken. Alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C

b) Ionenaustauschchromatographie

Dieser Schritt wurde durchgeführt indem DEAE-Sephacel-Säulen (2,5 x 40 cm) mit Proben konzentrierten und dialysierten Harns, enthaltend je ca. 75 g Protein, beschickt wurden. Eluiert wurde mit 800 ml eines

35 NaCl/10 mM Tris/HCl pH-8-Gradienten, wobei die NaCl Konzentration 0 bis 0,4 M betrug. Die das TNF-BP enthaltenden Fraktionen von sieben Säulen mit einem Gesamtproteingehalt von 114 g wurden bei -20°C gelagert.

c) Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der TNF-Sepharosesäule wurde rTNF- α (15 mg) in 0,1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 9 (Kopplungspuffer) an 1,5 g cyanogenbromidaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Die Sepharose

40 wurde in 1 mM HCl gequollen und mit Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zusatz von rTNF- α wurde die Suspension 2 Stunden lang bei Raumtemperatur rotieren gelassen. Der Überschuß an CNBr-Gruppen wurde durch eineinhalbstündige Rotation mit 1 M Ethanolamin, pH 8 blockiert. Die TNF-Sepharose wurde einige Male abwechselnd in 1 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 8 und 1 M NaCl, 0,1 M Borsäure pH 4

45 gewaschen und anschließend in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 1 mM Benzamidinhydrochlorid gelagert. Die aus Schritt b) erhaltenen Fraktionen wurden auf eine Konzentration von 0,2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8 eingestellt. Die TNF-Sepharose wurde in eine Säule gepackt und mit 0,21 M NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8 gewaschen und die TNF-BP enthaltenden Fraktionen, entsprechend ca. 30 g Protein, bei einer Durchflußrate von 10 ml/h aufgetragen und ausgiebig mit 0,2 M NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8 gewaschen, bis im Eluat bei 280 nm keine Absorption mehr nachweisbar war. Anschließend wurde TNF-BP mit

50 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert.

TNF-BP enthaltende Fraktionen aus 4 Auftrennungen wurden vereinigt und nach Zusatz von Polyethylenglykol (MG 6000) — bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml — lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wurde in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert. (Die dialysierte Probe (4 ml) wurde in

55 tiefgefrorenem Zustand gelagert.)

Dieser Reinigungsschritt brachte gegenüber dem vorangegangenen eine weitere Anreicherung um das ca. 9000fache. SDS-PAGE (durchgeführt, wie in Vorversuch 2 beschrieben) der TNF-BP enthaltenden Fraktionen zeigte die Elution von drei Hauptkomponenten mit Molekulargewichten von 28 000, 30 000 und 50 000.

d) Reverse Phase Chromatographie

Ein aliquoter Anteil (1 ml) der aus Schritt c) erhaltenen Fraktionen mit einem Zusatz von 0,1% Trifluoressigsäure wurde auf eine ProRPC HR 5/10 Säule (Pharmacia), die an ein FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1%iger Trifluoressigsäure equilibriert und bei

65 Raumtemperatur mit einem linearen 15 ml Gradienten von 10 Vol% bis 50 Vol% Acetonitril, enthaltend 0,1% Trifluoressigsäure, beschickt; die Durchflußrate betrug 0,3 ml/min. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280 nm sowie die Aktivität des TNF- α bindenden Proteins mit Hilfe des Kompetitionsbindungstest, wie im Beispiel 1 angegeben, bestimmt, wobei jeweils 0,01 μ l Probe verwendet wurden. TNF-BP eluierte als ein einziger Aktivitätspeak entsprechend einem scharfen UV-Absorptionspe-

ak.

Dieser letzte Reinigungsschritt brachte eine Zunahme der spezifischen Aktivität um das ca. 29fache, die Gesamtzunahme an Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial (konzentrierter Dialyseharz) betrug das ca. $1,1 \times 10^6$ -fache.

SDS-PAGE der reduzierten und nicht reduzierten Probe, durchgeführt wie in Vorversuch 2 angegeben, ergab eine diffuse Bande, die auf das Vorhandensein eines einzigen Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 hinwies. Das diffuse Erscheinungsbild der Bande kann auf das Vorliegen einer oder mehrerer heterogener Glykosylierungen und/oder eines zweiten, in geringer Menge vorhandenen Polypeptids zurückzuführen sein. Die Annahme, dabei könnte es sich um ein Polypeptid mit dem in Vorversuch 3d als Nebensequenz bestimmten N-Terminus handeln, das gegenüber TNF-BP am N-Terminus verlängert ist, wurde durch die Sequenz der cDNA bestätigt, wonach zwischen der Signalsequenz und Asn (Pos. 12) ein Abschnitt von 11 Aminosäuren vorliegt, dessen Sequenz mit der N-terminalen Nebensequenz übereinstimmt und der offensichtlich vom prozessierten Protein abgespalten wird.

Vorversuch 2

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (24) auf 18 cm langen, 16 cm breiten und 1,5 mm dicken Flachgelen mit 10 Taschen mittels einer LKB 2001 Elektrophorese-Einheit durchgeführt. Der Proteingehalt der Proben aus den Reinigungsschritten c) und d) (Vorversuch 1) wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt bzw. aus der Absorption bei 280 nm berechnet, wobei einer Absorption von 1,0 ein Gehalt von 1 mg TNF-BP/ml zugeordnet wurde.

Die Proben, enthaltend ca. 25 µg Protein (aus Vorversuch 1c) bzw. ca. 5 µg (aus 1d) in reduzierter (β -Mercaptoethanol) und nicht reduzierter Form wurden auf ein 3%iges Sammelgel und ein 5 bis 20%iges lineares Polyacrylamidgradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA/Gel ohne Kühlung gefahren. Als Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) wurden Phosphorylase B (MG 94 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Ovalbumin (MG 43 000), Karboanhydrase (MG 30 000), Sojabohnen-Trypsininhibitor (MG 20 100) und α -Laktalbumin (MG 14 400) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Blue in 7%iger Essigsäure/40%igem Ethanol gefärbt und in 7%iger Essigsäure/25%igem Ethanol entfärbt.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigte TNF-BP als Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000.

Vorversuch 3

a) Probenvorbereitung

15 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion wurde gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst und direkt für die Aminosäuresequenzanalyse verwendet.

b) Aminosäuresequenzanalyse

Die automatische Aminosäuresequenzanalyse wurde mit einem Applied Biosystems 477 A Flüssigphasensequenator durch On-line Bestimmung der freigesetzten Phenylthiohydantoin-Derivate mittels Applied Biosystems Analysator, Modell 120 A PTH, durchgeführt.

Sie ergab die folgende N-terminale Sequenz als Hauptsequenz (ca. 80% der Proteinmenge): Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln.

Daneben war folgende Nebensequenz nachzuweisen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-. (Die in Klammer stehenden Aminosäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden.)

Vorversuch 4

SDS-PAGE

Die Probenvorbereitung wurde wie im Vorversuch 3 durchgeführt mit dem Unterschied, daß die Probenmenge 10 µg betrug. Die Probe wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und in 4 Portionen geteilt. Einer der vier aliquoten Teile wurde zur Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (24) mit DTT (Dithiothreitol) reduziert und auf Minigelen (Höfer, 55 x 80 x 0,75 mm, 15%) getrennt; als Molekulargewichtsmarker wurde der im Vorversuch 8 angegebene verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Methode von Oakley (25). Das Elektropherogramm ist in Fig. 9 dargestellt. Es zeigt eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30 000.

Beispiel 1

a) Tryptic Peptide Mapping

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige

Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 60 µl 1%igem Ammoniumbicarbonat gelöst.

Dieser Lösung wurden 1% w/w, entsprechend 0,6 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) zugesetzt und die Reaktionsmischung 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden nochmals 1% w/w Trypsin zugesetzt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde der Reaktionsansatz anschließend mit 60 µl 6 M Harnstoff und mit 12 µl 0,5 M Dithiothreitol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die Auftrennung der entstandenen tryptischen Spaltpeptide erfolgte über Reverse Phase HPLC, wobei eine Delta Pak C18 Säule (Waters, 3,9 x 150 mm, 5 µm Teilchendurchmesser, 100 Å Porendurchmesser) bei 30°C und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet wurden. Die Gradientensteigerung betrug 0 bis 55% Eluens B in 55 min, danach wurde 55% B für 15 min beibehalten. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm (0,5 AUFS) und bei 280 nm (0,05 AUFS).

b) Sequenzanalyse von tryptischen Peptiden

Einige der nach a) gewonnenen tryptischen Spaltpeptide von TNF-BP wurden der automatischen Aminosäuresequenzanalyse unterworfen. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen aus der Reverse Phase HPLC gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst. Diese Lösungen wurden direkt für die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 477 A Pulsed Liquid Phase Sequenator eingesetzt. Tab. 1 enthält die Ergebnisse der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide, wobei die in Klammern angeführten Aminosäuren nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Die Angabe "X" bedeutet, daß an dieser Stelle die Aminosäure nicht identifiziert werden konnte.

In der Fraktion 8 konnte die Aminosäure in Position 6 nicht identifiziert werden. Die Sequenz -X-N-S- für die Position 6 - 8 läßt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt.

In der Fraktion 17 konnte die Aminosäure in Position 6 ebenfalls nicht identifiziert werden. Die Sequenz -X-N-S- (bereits in Fraktion 8 auftretend) für die Positionen 6 bis 8 läßt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt. Die ersten 13 Aminosäuren der Fraktion 17 sind weitgehend identisch mit der Fraktion 8; bei Fraktion 17 dürfte es sich somit um ein Peptid handeln, das durch unvollständige tryptische Spaltung entstanden ist.

Auffallend ist die Identität der Fraktion 21 mit den Positionen 7 bis 14 der Fraktion 27. Sowohl in Fraktion 21 als auch in Fraktion 27 bricht die Sequenz nach der Aminosäure Asparagin (Position 8 bzw. 14) plötzlich ab, obwohl hier keine tryptische Spaltung zu erwarten ist. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Aminosäure Asparagin (Position 8 in Fraktion 21 bzw. Position 14 in Fraktion 27) die C-terminale Aminosäure von TNF-BP sein könnte.

Auffallend ist die weitgehende Identität der Sequenz der nur in geringer Menge auftretenden Fraktion 12 mit der in Vorversuch 10 bestimmten Nebensequenz des N-Terminus. Daß die Proteine der Haupt- und Nebensequenz auf einer analytischen Reverse Phase HPLC-Säule (Vorversuch 3b) nicht trennbar waren, lieferte einen Hinweis dafür, daß es sich bei dem Protein mit der Nebensequenz um eine am N-Terminus verlängerte Form des TNF-BP handelt, die durch Prozessierung zum Großteil in das Protein mit der Hauptsequenz überführt wird.

Tabelle 1

Aminosäuresequenzen der analysierten tryptischen Peptide von TNF-BP

Fraktion	Aminosäuresequenz
1	D-S-V-C-P-Q-G-K
2	X-X-L-S(C)-S-K
3	D-T-V(C)-G(C)-R
4	E-N-E(C)-V-S(C)-S-N(C)-K
5	E-N-E(C)-V-S(C)(S)-N(C)-K(K)
8	Y-I-H-P-Q-X-N-S-I-X-X-X-K
11	E-C-E-S-G-S-F-T-A-S-E-N(N)(K)
12	L-V-P-H-L-G-D-R
13	K-E-M-G-Q-V-E-I-S-S(C)-T-V-D(R)
14/1	G-T-Y-L-Y-N-D-C-P-G-P-G-Q
14/11	(E)-M-G-Q-V(E)(I)(S)-X-X-X(V)(D)
15	K-E-M-G-Q-V-E-I-S-S(C)-T-V-D-R-D-T-V(C)-G
17	Y-I-H-P-Q-X-N-S-I(C)(C)-T-K(C)-H-K-G-X-Y
20	G-T-Y-L-Y-N-D-C-P-G-P-G-Q-D-T-X-X-R
21	L(C)-L-P-Q-I-E-N
26	Q-N-T-V(C)-T-X(H)-A-G-F(F)-L(R)
27	S-L-E(C)-T-K-L(C)-L-P-Q-I-E-N

Beispiel 2

Analyse des C-Terminus

Diese Analyse wurde nach dem Prinzip der in (31) beschriebenen Methode durchgeführt.

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 2d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 120 µl 10 mM Natriumacetat (auf pH 4 gestellt mit 1 N HCl) gelöst.

Dieser Lösung wurden 6 µl Brij 35 (10 mg/ml in Wasser) sowie 1,5 µl Carboxypeptidase P (0,1 mg/ml in Wasser, Boehringer Mannheim, Nr. 8 10 142) zugesetzt. Das entspricht einem Gewichtsverhältnis Enzym zu Protein von 1 zu 400 (36).

Sofort nach Zusatz des Enzyms wurde eine Probe von 20 µl der Reaktionsmischung entnommen und darin die enzymatische Reaktion durch Ansäuern mit 2 µl konzentrierter Trifluoressigsäure und durch Gefrieren bei -20°C unterbrochen.

Die Reaktionsmischung wurde im Kühlschrank (ca. 8°C) stehengelassen und Proben zu je 20 µl nach 10, 20, 60 und 120 Minuten entnommen. Der Rest der Reaktionsmischung wurde weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme durch Zusatz von 2 µl konzentrierter Trifluoressigsäure angesäuert und bei -20°C eingefroren, wodurch die enzymatische Reaktion unterbrochen wurde.

Parallel zum beschriebenen Probenansatz mit etwa 60 µg TNF-BP wurde unter identischen Bedingungen ein Reagentienblindwert angesetzt, dem kein Protein zugesetzt worden war.

Nach der letzten Probennahme wurden alle Proben 30 Minuten lang in einem Speed Vac Concentrator getrocknet, mit 10 µl einer Lösung aus 2 Teilen Äthanol, 2 Teilen Wasser und 1 Teil Triäthylamin (= "Redrying solution" des Picotag-Aminosäureanalyzesystems der Fa. Waters) versetzt und nochmals kurz getrocknet. Danach wurden die Proben zur Derivatisierung der vom C-Terminus abgespaltenen Aminosäuren mit je 20 µl des "Derivatisation Reagents" (7 : 1 : 1 : 1 = Äthanol : Wasser : Triäthylamin : Phenylisothiocyanat; Picotag-System) versetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 1 Stunde in einem Speed Vac Concentrator getrocknet.

Zur Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurden die Proben in 100 µl "Sample Diluent" (Picotag-System der Fa. Waters) gelöst. Von diesen Lösungen wurden je 50 µl mit Reverse Phase HPLC (Säule, mobile Phase und Gradient nach Originalvorschrift des Picotag-Systems der Fa. Waters) analysiert. Die Chromatogramme der Proben und Reagentienblindwerte wurden mit dem Chromatogramm eines analog derivatisierten Gemisches (100 pMol/Aminosäure) von Standardamino-säuren (Fa. Beckman) verglichen.

Wie aus den quantitativen Ergebnissen der Picotag-Aminosäureanalyse (Tabelle 2) ersichtlich ist, ist Asparagin mit hoher Wahrscheinlichkeit die C-terminale Aminosäure von TNF-BP. Neben Asparagin konnten nach 240 Minuten Reaktionszeit auch Glutaminsäure und in geringerer Menge Isoleucin nachgewiesen werden. Signifikant über dem Reagentienblindwert liegende Mengen von anderen Aminosäuren konnten auch nach 240 Minuten Reaktionszeit nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis (-I-E-N als C-Terminus) bestätigt die aus der N-terminalen Sequenzierung der tryptischen Peptide 21 und 27 abgeleitete Vermutung, daß die bei diesen Peptiden C-terminal identifizierten Aminosäuren -I-E-N (Beispiel 1b) den C-Terminus von TNF-BP darstellen.

Tabelle 2

Quantitative Auswertung der Picotag-Aminosäureanalyse nach Reaktion von Carboxypeptidase P mit TNF-BP

Reaktionszeit	Integratoreinheiten für die Aminosäuren		
	Isoleucin	Glutaminsäure	Asparagin
0	—	—	—
10	—	—	—
20	—	—	83 304
60	—	—	168 250
120	—	—	319 470
240	85 537	152 350	416 570

Methoden zu den Beispielen 3 bis 7:

Um die Beschreibung der nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden bzw. Bezeichnungen kurz beschrieben:

"Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) an für diese spezifischen Stellen (Restriktionsstellen). Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt. Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und normalerweise einer römischen Ziffer, bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die

betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z.B.: Sma I: *Serratia marcescens*). Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5'-Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z.B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben, werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z.B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen. Nach der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt und die DNA aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA Fragments bedeutet die Auftrennung der durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente, z.B. auf einem 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidiumbromid (EtBr) wird das gewünschte Fragment anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese an DE 81 Papier (Schleicher und Schüll) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Pufferlösung (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH = 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH = 7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extrachromosomal oder chromosomal integriert. Transformation von *E. coli* folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Bestimmung der Nukleotidsequenz. Dazu wird zunächst die zu sequenzierende DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente werden in entsprechend geschnittene M13 mp8, mp9, mp18 oder mp19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder es werden die DNA mittels Ultraschall fragmentiert, die Enden repariert und die größenselektierten Fragmente in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp8 DNA eingebracht (Shotgun Methode). Nach der Transformation von *E. coli* JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/53/12) isoliert und nach der Didesoxymethode (30) sequenziert. Als Alternative zur Verwendung des Klenowfragment der *E. coli* DNA Polymerase I bietet sich dabei die T7-DNA Polymerase an ("Sequenase, Fa. United States Biochemical Corporation"). Die Sequenzreaktionen werden entsprechend dem Handbuch "Sequenase: Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing With Sequenase" durchgeführt.

Eine weitere Sequenziermethode besteht im Klonieren der zu sequenzierenden DNA in einen Vektor, der unter anderem einen Replikationsursprung eines DNA-Einzelstrangphagen (M13, f1) trägt (z.B. Bluescribe oder Bluescript M13 von Stratagene). Nach Transformation von *E. coli* JM101 mit dem rekombinanten Molekül können die Transformanten mit einem Helferphagen, z. B. M13K07 oder R408 von Promega) infiziert werden. Als Resultat erhält man eine Mischung aus Helferphagen und verpacktem, einzelsträngigem rekombinanten Vektor. Die Aufarbeitung der Sequenziervorlage (Template) erfolgt in Analogie zu der M13 Methode.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mittels der ursprünglich von R. Staden (27) entwickelten und von Ch. Pieler (28) modifizierten Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,02 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (29: 474). "Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS Methode, modifiziert nach Birnboim und Doly (29: 368 - 369) unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet. Sequenzprimer werden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Andere Oligonukleotide werden bis zu einer Kettenlänge von 70 durch die "OPC"-Methode gereinigt (OPC = Oligonucleotide purification column, Applied Biosystems, Product Bulletin, January 1988). Längere Oligonukleotide werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese (6% Acrylamid, 0,15% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, TBE-Puffer) gereinigt und nach der Elution aus dem Gel über eine G-25 Sepharosesäule entsalzt.

Beispiel 3

Herstellung von TNF-BP-spezifischen Hybridisierungssonden

Die Auswahl der Oligonukleotide wurde im Hinblick auf deren Verwendung zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR getroffen:

- a) Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des TNF-Bindungsproteins (Hauptsequenz, erhalten aus Vorversuch 3 und Beispiel 1, Fraktion I)
Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-
wurde ein Heptapeptid-Bereich ausgewählt, der die niedrigste Komplexität eines gemischten Oligonukleotids zum Hybridisieren an cDNA zulaßt: Es sind dies die Aminosäuren 6 bis 12. Um die Komplexität des

Mischoligonukleotids herabzusetzen, wurden vier Mischoligonukleotide mit einer Komplexität von jeweils 48 hergestellt. Die Oligonukleotide wurden in Richtung der mRNA hergestellt, sie sind somit zum 3'Ende der Sequenz orientiert und identisch mit dem nichtkodierenden Strang des TNF-BP-Gens:

Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro

5

5'CAA GGT AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/1 EBI-1639

G G C C C

10

A

5'CAA GGC AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/2 EBI-1640

15

G G C C C

A

5'CAA GGA AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/3 EBI-1641

20

G G C C C

A

25

5'CAA GGG AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/4 EBI-1642

G G C C C

30

A

b) Aus der Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptides (Fraktion 11 des tryptischen Verdaus) der Aminosäuresequenz

35

Glu-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-(Glu/Cys)-Asn-
Asn-Lys (vgl. Beispiel 1)

40

wurde ein Peptid-Bereich ausgewählt und ein weiterer Satz von Mischoligonukleotiden synthetisiert:

45

50

55

60

65

-Phe-Thr-Ala-Ser-Glu-Asn-Asn-Lys

Cys

TNF-BP #4/5 (EBI-1653):

3'AAA TGA CGG AGA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'

G G T T T

T

TNF-BP #4/6 (EBI-1654):

3'AAA TGA CGG TCA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'

G G T G T

T

TNF-BP #4/7 (EBI-1657):

3'AAA TGA CGG AGA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'

G G T T G

T

TNF-BP #4/8 (EBI-1658):

3'AAA TGA CGG TCA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'

G G T G G

T

Die Oligonukleotide wurden komplementär zur mRNA synthetisiert und sind somit zum 5'Ende der Sequenz orientiert. Um das amplifizierte DNA-Fragment im Anschluß an die PCR effizient klonieren zu können, wurde auch ein BamHI-Linker am 5'Ende der Oligonukleotide vorgesehen. Werden z.B. die Oligonukleotide TNF-BP #4/5-8 gemeinsam mit TNF-BP #3/1-4 für die PCR an der gesamten Lambda-DNA einer Bibliothek eingesetzt, kann ein etwa resultierendes DNA Fragment mit BamHI nachgeschnitten werden. Die Partner-Oligonukleotide ergeben ein gerades Ende am 5'Terminus, das Fragment kann somit in die SmaI-BamHI-Stellen eines geeigneten Vektors kloniert werden. Jedes Mischoligonukleotid TNF-BP #4/5 bis 8 ist eine Mischung aus 48 Einzelnukleotiden und berücksichtigt einige Codons nicht, und zwar:

Thr	ACG
Ala	GCG und GCT
Ser	TCG und TCC
Asn	AAT

Bei GCT wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das zu GCC (Ala) komplementäre Triplet CGG durch Ausbildung einer G-T Brücke wirksam sein kann, bei TCG (Ser) und AAT (Asn) gilt dasselbe bezüglich AGT bzw. TTG. ACG, GCG und TCG sind äußerst seltene Codons (CG-Regel) und wurden deshalb nicht berücksichtigt.

Beispiel 4

Amplifizierung einer für TNF-BP kodierenden Teilsequenz aus einer cDNA-Bibliothek.

a) Isolierung von Lambda-DNA einer cDNA Bibliothek

Die Herstellung der cDNA Bibliothek erfolgte nach der in der EP-A1-02 93 567 für die humane plazentale

cDNA Bibliothek beschriebenen Methode mit dem Unterschied, daß als Ausgangsmaterial 10^9 Fibrosarkomzellen der Zelllinie HS 913 T, die unter Stimulierung mit humanem TNF- α (10 ng/ml) hochgezüchtet worden waren, verwendet wurden. Statt Lambda gt10 wurde Lambda gt11 verwendet (cDNA Synthese: Amersham RPN 1256; EcoRI verdaute Lambda gt11 Arme: Promega Biotech; in vitro Verpacken der ligierten DNA: Gigapack Plus, Stratagene).

5 ml des Phagenüberstandes der amplifizierten cDNA Bibliothek der humanen Fibrosarkom Zelllinie HS913T in Lambda gt11 wurden mit 0,5 μ g RNase A und 0,5 μ g DNase I versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde 10 min bei 5000xg zentrifugiert, der Überstand durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert. Die Lambda-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris pH=7,5; 1 mM EDTA) gelöst.

b) PCR Amplifizierung einer TNF-BP Sequenz aus einer cDNA Bibliothek

Für die Anwendung der PCR (26) auf DNA der HS913T cDNA Bibliothek wurden 16 Einzelreaktionen durchgeführt, in welchen jeweils eines der 4 Mischoligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641, EBI-1642 als erster Primer und eines der vier Mischoligonukleotide EBI-1653, EBI-1654, EBI-1657, EBI-1658 als zweiter Primer eingesetzt wurde. Jedes dieser Mischoligonukleotide enthält 48 verschiedene Oligonukleotide gleicher Länge. Die Amplifizierung mittels PCR fand in 50 μ l Reaktionsvolumen, enthaltend 250 ng Lambda-DNA der cDNA-Bibliothek, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH=8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,2 mM jedes der 4 desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 200 pMol erster und zweiter Primer, 1,25 Einheiten Taq Polymerase (Perkin-Elmer Cetus) statt. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurde die Lösung mit einigen Tropfen Mineralöl (0,1 ml) überschichtet. Die PCR wurde in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden 5 Minuten auf 94°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren, und anschließend 40 Amplifikationszyklen unterworfen. Ein Zyklus bestand aus 40 Sekunden Inkubation bei 94°C, 2 Minuten Inkubation bei 55°C und 3 Minuten Inkubation bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben für weitere 7 Minuten bei 72°C inkubiert, um sicherzustellen, daß die letzte Primer-Verlängerung vollständig verläuft. Nach Abköhlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol präzipitiert.

5 μ l jeder der 16 PCR-Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Die stärkste DNA Bande, ein Fragment von 0,16 kb Länge, war in den PCR-Proben zu sehen, die mit dem Oligonukleotid EBI-1653 als erstem Primer und einem der Oligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641 oder EBI-1642 als zweitem Primer amplifiziert worden waren. Da die mit dem Primerpaar EBI-1653 und EBI-1642 amplifizierte Probe die größte Menge an diesem 0,16 kb DNA-Fragment enthielt, wurde diese Probe für die weitere Aufarbeitung ausgewählt.

Beispiel 5

Klonierung und Sequenzierung eines durch PCR Amplifikation gewonnenen DNA-Fragments

Das erhaltene PCR-Produkt der Primer EBI-1642 und EBI-1653 wurde mit BamHI geschnitten und nachfolgend elektrophoretisch in einem Agarosegel (1,5% NuSieve GTG Agarose plus 1% Seakem GTG Agarose, FMC Corporation) nach der Größe aufgetrennt. Die Hauptbande, ein DNA Fragment von 0,16 kb Länge, wurde aus dem Gel elektroeluiert und mit Ethanol präzipitiert. Dieses DNA Fragment wurde mit BamHI/SmaI geschnittenem Plasmid pUC18 (Pharmacia) ligiert und E. coli JM101 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Die nach der Minipräparationsmethode hergestellten Plasmide wurden durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRI-BamHI und nachfolgender Elektrophorese in Agarosegelen charakterisiert. Das Plasmid pUC18 enthält zwei Schnittstellen für PvuII, die in einem 0,32 kb DNA-Fragment die Polyklonierstelle flankieren. Sehr kurze DNA-Inserts in der Polyklonierstelle des Plasmids können nach Schneiden mit PvuII leichter im Agarosegel sichtbar gemacht werden, da sich die Länge um 0,32 kb vergrößert. Durch Schneiden mit EcoRI und BamHI kann das in den mit BamHI und SmaI geschnittenen Plasmidvektor ligierte DNA-Fragment inklusive einiger Basenpaare der Polylinkersequenz erhalten werden. Ein Klon mit dem gewünschten Insert wurde als pTNF-BP3B bezeichnet. Das gesamte DNA-Insert dieses Klons wurde nach Subklonieren eines EcoRI-BamHI Fragments in M13mp18 (Pharmacia) nach der modifizierten Dideoxy Methode mit Sequenase (United States Biochemical Corporation) sequenziert.

Die Analyse der durch PCR-amplifizierten DNA ergab folgende Sequenz (nur der nicht kodierende Strang ist abgebildet, darüber die abgeleitete Aminosäuresequenz):

5	10
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys	
CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC	

15

20

25

Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp
 TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC

30

35

Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys
 TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT

40

45

50

Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn Asn Lys
 GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG GAT CC

Die ersten 20 und die letzten 29 Nukleotide (in Kursivschrift) entsprechen den Sequenzen der Primer-Oligonukleotide EBI-1642 bzw. dem Komplement von EBI-1653. Die Aminosäuren 38 bis 43 bestätigen die restliche Sequenz des tryptischen Peptides 11.

Weiters enthält das mittels PCR erzeugte DNA-Fragment die Sequenz des Peptides der Fraktion 20 des tryptischen Verdaus (Aminosäuren 20 bis 34, unterstrichen). Damit ist erwiesen, daß der Klon pTNF-BP3B von einer cDNA abgeleitet wurde, die für TNF-Bindungsprotein kodiert.

pTNF-BP3B stellt damit eine Sonde, z.B. zum Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken nach TNF-BP cDNAs, dar.

Beispiel 6

Isolierung von TNF-BP cDNA Klonen

Ca. 720 000 Phagen der HS913T cDNA Bibliothek in Lambda gt11 wurden auf Ecoli Y1088 (Δ lacU169, pro: Tn5, tonA2, hsdR, supE, supF, metB, trpR, F⁻, λ^- , (pMC9)) plattiert (ca. 60 000 Phagen pro 14,5 cm Petrischale, LB-Agar: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1,5% Agar, Plattieren in Top-Agarose: 10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose). Von jeder Platte wurden zwei Nitrozellulosefilter-Abzüge hergestellt. Die Filter wurden vorgewaschen (16 Stunden bei 65°C) in:

50 mM Tris/HCl, pH = 8,0
 1 M NaCl
 1 mM EDTA
 0,1% SDS

Die Filter wurden zwei Stunden bei 65°C prähybridisiert in:
 6 x SSC (0,9 M NaCl, 0,09 M tri-Nacitrat)
 5 x Denhardt's (0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% BSA [= Rinderserumalbumin])
 0,1% SDS

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde

pTNF-BP 3B wurde mit BamHI und EcoRI doppelt geschnitten und das ca. 0,16 kb Insert isoliert. 0,6 μ g des Inserts in 32 ml werden bei 100°C denaturiert und mit je 60 pMol EBI-1642 und EBI-1653 durch Abkühlen auf 80°C über 10 Minuten und jähes Abkühlen in Eiswasser geprimt. Nach Zusatz von

10 μ l α -³²P-dCTP (100 μ Ci, 3,7 MBq)
 5 μ l 10 x Priming Puffer (0,1 M Tris/HCl, pH = 8,0, 50 mM mgCl₂)
 2 μ l je 1 mM dATP, dGTP, dTTP
 1 μ l PolIK (Klenow Fragment der E. coli DNA Polymerase I, 5 Einheiten)

wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (10 Minuten auf 70°C) erfolgt das Abtrennen der nichteingebauten Radioaktivität durch Chromatographie über Biogel P6DG (Biorad) in TE Puffer (10 mM Tris/HCl, pH = 8, 1 mM EDTA). Eingebaut wurden 65 x 10⁶ cpm.

Das Hybridisieren der Filter erfolgte in einem Gesamtvolumen von 80 ml 6 x SSC/5X Denhardt's/0,1% SDS plus hitzedenaturierter Hybridisierungs-sonde während 16 Stunden bei 65°C.

Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur in 6 x SSC/0,01% SDS und einmal 45 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC/0,01% SDS und dreimal 30 Minuten bei 65°C in 2 x SSC/0,01% SDS gewaschen.

Die Filter wurden luftgetrocknet und anschließend an Amersham Hyperfilm 16 Stunden unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70°C exponiert. Insgesamt wurden 30 hybridisierende Plaques identifiziert (Lambda-TNF-BP # 1–30).

Die Regionen mit den hybridisierenden Plaques wurden möglichst präzise ausgestochen, und die Phagen in 300 ml SM Puffer plus 301 ml Chloroform eluiert. Durch "Plaquareinigung" (Plattieren von ca. 200 Phagen pro 9 cm Petrischale beim zweiten Durchgang, bzw. ca. 20 Phagen pro 9 cm Petrischale beim dritten Durchgang, Filterabzüge doppelt, Vorbereiten, Hybridisieren und Waschen wie beim erstmaligen Durchsuchen beschrieben) wurden letztlich 25 hybridisierende Phagen vereinzelt (Lambda-TNF-BP # 1–10, 12–24, 29, 30).

Darstellung der rekombinanten Lambda-DNA von den Klonen Lambda-TNF-BP # 13, 15, 23, 30.

2×10^6 Phagen wurden auf Ecoli Y1088 in Topagarose (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose) plattiert (14,5 cm Petrischale mit LB-Agarose (1,5% Agarose, 0,2% Glucose, 10 mM MgSO_4 , 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Platten (30 Minuten bei 4°C) wurde mit 10 ml Lambda-Diluent (10 mM Tris/HCl pH = 8,0, 10 mM MgCl_2 , 0,1 mM EDTA) überschichtet und 16 Stunden bei 4°C eluiert. Der Überstand wurde in 15 ml Corex Röhrchen transferiert und 10 Minuten bei 15 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman J2-21 Zentrifuge, JA20 Rotor). Der Überstand wurde in 10 ml Polycarbonat-Röhrchen dekantiert und bei 50 000 rpm, 20°C bis $\omega^2 t = 3 \times 10^{10}$ zentrifugiert (Beckman L8-70, 50 Ti Rotor). Das Pellet wurde in 0,5 ml Lambda-Diluent resuspendiert und in Eppendorf Röhrchen (1,4 ml) transferiert. Nach Zusatz von 5 mg RNase A und 0,5 mg DNase I und Inkubation bei 37°C während 30 Minuten und Zusatz von 25 ml 0,5 M EDTA, 12,5 ml 1 M Tris/HCl pH = 8,0, 6,5 ml 20% SDS erfolgte weitere Inkubation bei 70°C für 30 Minuten. Die Lambda DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Abschließend wurde die DNA in 100 ml TE-Puffer gelöst.

Beispiel 7:

Subklonierung und Sequenzierung von TNF-BP cDNA Klonen 15 und 23

Um die cDNAs der Klone Lambda-TNF-BP15 und Lambda-TNF-BP23, die bei der Hybridisierung die stärksten Signale gezeigt hatten, näher zu charakterisieren, wurden die cDNA-Inserts mit EcoRI aus der Lambda-DNA herausgeschnitten, nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel eluiert und mit Äthanol präzipitiert. Die DNA-Fragmente von 1,3 kb (von Lambda-TNF-BP15) und 1,1 kb (von Lambda-TNF-BP23) wurden mit EcoRI geschnittenem und mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm dephosphoryliertem Plasmidvektor pT7/T3 α -18 (Bethesda Research Laboratories) mit T4 DNA Ligase ligiert und Ecoli JM101 transformiert. Von einzelnen Bakterienkolonien, die nach Selektion auf Agaroseplatten mit Ampicillin und X-gal keine blaue Färbung aufwiesen, wurde im Minipräparationsverfahren Plasmid-DNA hergestellt und durch Schneiden mit EcoRI und HindIII das Vorhandensein und die Orientierung des cDNA Inserts festgestellt. Plasmide, die das EcoRI Insert der Phagen Lambda-TNF-BP15 bzw. Lambda-TNF-BP23 so orientiert enthielten, daß das dem 5'-Ende der mRNA entsprechende Ende dem T7 Promoter zugewandt ist, wurden pTNF-BP15 bzw. pTNF-BP23 benannt.

Die EcoRI Inserts von Lambda-TNF-BP15 und Lambda-TNF-BP23 wurden ebenfalls in mit EcoRI geschnittenen und dephosphorylierten M13mp19 Vektor ligiert und Ecoli JM101 transformiert. Von einigen wahllos ausgewählten M13 Klonen wurde Einzelstrang-DNA präpariert und als Vorlage für die Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode verwendet.

An M13 Klonen, die die cDNA-Inserts in entgegengesetzter Orientierung enthielten, wurden mit dem universellen Sequenzierprimer und spezifisch synthetisierten Oligonukleotidprimern, die an das cDNA-Insert binden, beide DNA-Stränge vollständig sequenziert.

Die vollständige Nukleotidsequenz von 1334 Basen des cDNA-Inserts von Lambda-TNF-BP15 bzw. pTNF-BP15 ist in Fig. 1 dargestellt. Die Basen 1–6 und 1328–1334 entsprechen den EcoRI-Linkern, die bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek an die cDNA angefügt worden waren. Die Nukleotidsequenz des cDNA-Inserts von Lambda-TNF-BP23 entspricht der von Lambda-TNF-BP15 (Basen 22–1100), flankiert von EcoRI-Linkern.

Literatur

1. Carswell, E. A., et al. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 25: 3666–3670.
2. Old, L. J. 1987. Nature (Lond.) 326: 330–331.
3. Aggarwal, B. B., et al. et al. 1985. Nature 318: 665–667.
4. Gullberg, U., et al. et al. 1987. Eur. J. Haematol. 39: 241–251.
5. Beutler, B., et al. et al. 1985. Nature 316: 552–554.
6. Torti, F. M. et al. 1985. Nature (Lond.) 229: 867–869.
7. Mahoney Jr., J. R., et al. 1985. J. Immunol. 134: 1673–1675.
8. Shalaby, M. R., et al. 1985. J. Immunol. 135: 2069–2073.
9. Klebanoff, S. J., et al. 1986. J. Immunol. 136: 4220–4225.
10. Mestan, J., et al. 1986. Nature (Lond.) 323: 816–819.
11. Wong, G. H. W., et al. 1986. Nature (Lond.) 323: 819–822.
12. Cerami, A., et al. 1988. Immunol. Today 9: 28–31.
13. Tracey, K. J., et al. 1986. Science (Wash. D. C.) 234: 470–474.
14. Tracey, K. J., et al. 1987. Nature (Lond.) 330: 662–666.
15. Figuei, P. F., et al. 1987. Immunobiol. 175: 27

16. Waage, A., et al. 1987. *Lancet* ii: 355—357.
17. Seckinger, P., et al. 1987. *J. Immunol.* 139: 1546—1549.
18. Beutler B., et al. 1988. A common mediator. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 505—18.
19. Oliff A., et al. 1987. *Cell* 555—63.
20. Seckinger P., et al. 1988. *J. Exp. Med.* 1511—16.
21. Olsson I., et al. 1988. *Eur. J. Haematol.* 41: 414—420.
22. Olsson I., et al. 1989. *Eur. J. Haematol.* 42: 270—275.
23. Creasey, A. A., et al. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84: 3293—3297.
24. Laemmli U. K. 1970. *Nature (London)* 227: 680—4.
25. Oakley, B. R., et al. 1986. 105: 361—363.
26. Saiki, R. K., 1988. *Science* 239: 487—491.
27. Staden, R., 1982. *Nucleic Acid Res.* 10: 4731—4751.
28. Pieler Ch., 1987. Dissertation, Universität Wien.
29. Maniatis, T., et al. 1982. *Molecular Cloning A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: 474.
30. Sanger et al. 1977. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463—5467.
31. Hsieng, S. L., et al. 1988. *J. Chromatographie* 447: 351—364.
32. Stauber, G. B., et al. 1988. *J. Biolog. Chem.* 35, Vol. 263: 19098—19104.
33. Aggarwal, B. B., et al. 1985. *Nature* 318: 655—667.
34. Locksley, R. M., et al. 1987. *J. Immunol.* 139: 1891—1895.
35. Stauber, G. B., et al. 1989. *J. Biolog. Chem.* 6, Vol. 264: 3573—3576.
36. Frohman, M. A., et al. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 85: 8998—9002.

Patentansprüche

1. DNA, kodierend für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden bzw. für ein Polypeptid, von dem dieses TNF bindende Protein eine Teilsequenz darstellt.
2. DNA nach Anspruch 1, kodierend für TNF bindendes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel

```

R2  GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC
    CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC
    AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG
    GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC
    TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC
    CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG
    GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC CGG GAC ACC
    GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT
    TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC
    CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG
    GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT
    TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC TCC TGT AGT
    AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC
    CTA CCC CAG ATT GAG AAT
  
```

aufweist, wobei R² gegebenenfalls fehlt oder eine für ein in vivo abspaltbares (Poly)peptid kodierende DNA darstellt, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

3. DNA nach Anspruch 2, kodierend für sekretierbares TNF bindendes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Anspruch 2 definierte Formel aufweist, wobei R² eine zur Gänze oder teilweise für eine Signalsequenz kodierende DNA darstellt.

4. DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R² die Formel CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA aufweist.

5. DNA Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß R² für R³ CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA steht, wobei R³ eine für ein Signalpeptid kodierende DNA darstellt.

6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß R³ für ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA steht.

7. DNA nach Anspruch 1, kodierend für einen TNF-Rezeptor bzw. einen Abschnitt davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel

ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA
 CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC
 TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC
 AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA
 TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
 AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT
 CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
 GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC
 AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA
 ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC
 CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC
 AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC
 TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC
 CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG

AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC
 ACT GAG GAC TCA GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG
 GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA TCC CTC CTC
 TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA
 CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT ACT
 AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT
 CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG
 CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA
 GAG GTG GCA CCA CCC TAT CAG GGG GCT GAC CCC ATC
 CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC CCC AAC
 CCC CTT CAG AAG TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA
 CAG AGC CTA GAC ACT GAT GAC CCC GCG ACG CTG TAC
 GCC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC TGG R¹

aufweist, wobei R¹ für einen DNA-Abschnitt steht, der für die C-terminale Region der zytoplasmatischen Domäne des TNF-Rezeptors kodiert, bzw. daß sie den für den entsprechenden Rezeptor-Abschnitt kodierenden Abschnitt darstellt, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

8. Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit der im Anspruch 7 definierten DNA unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisiert.

9. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierte DNA enthält.

10. Rekombinantes DNA Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens eine in Anspruch 1 oder 7 definierte DNA enthält.

11. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 9, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß es mit der in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierten DNA funktionell verbundene Expressionskontrollsequenzen enthält.

12. Rekombinantes DNA Molekül nach Anspruch 10, replizierbar in eukaryotischen Wirtsorganismen,

dadurch gekennzeichnet, daß es mit einer in Anspruch 1 oder 7 definierten DNA funktionell verbundene Expressions-Kontrollsequenzen enthält.

13. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit mindestens einem rekombinanten DNA Molekül gemäß Anspruch 11 transformiert ist.

14. Wirtsorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mit mindestens einem rekombinanten DNA Molekül gemäß Anspruch 12 transformiert ist.

15. Wirtsorganismus nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Säugetierzelle ist.

16. Verwendung des Wirtsorganismus nach Anspruch 15 zum Untersuchen von Substanzen auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β .

17. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierten DNA kodiert wird.

18. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer in Anspruch 1 oder 7 definierten DNA kodiert wird.

19. Verwendung von Polypeptiden nach Anspruch 17 oder 18 zum Untersuchen von Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit TNF- α und/oder TNF- β bzw. deren Rezeptor und/oder ihre Beeinflussung deren biologischer Wirkung.

20. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit rekombinanter DNA gemäß Anspruch 11 transformiert und gezüchtet und das exprimierte Protein isoliert wird.

21. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit rekombinanter DNA gemäß Anspruch 12 transformiert und gezüchtet und das exprimierte Protein isoliert wird.

22. Polypeptid nach Anspruch 17 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt.

23. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen.

24. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen.

25. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von parasitären Erkrankungen.

26. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von Schockzuständen.

27. Polypeptid nach Anspruch 17 zur Behandlung von pathologischen Zuständen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α auftreten.

28. Polypeptid nach Anspruch 17 als Diagnostikum zur Bestimmung von TNF- α und/oder TNF- β .

29. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- α wirksam hemmende Menge eines Polypeptids nach Anspruch 17.

30. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- β wirksam hemmende Menge eines Polypeptids nach Anspruch 17.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1/2

125	130	135
Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val		
AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG		
666	675	684
693	702	
140	145	150
Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val		
TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC		
711	720	729
738	747	
155	160	165
Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys		
TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC		
756	765	774
783	792	
170	175	180
Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr		
CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC ACT GAG GAC TCA GGC ACC		
801	810	819
828	837	
185	190	195
Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu		
ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA		
846	855	864
873	882	
200	205	210
Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys		
TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG		
891	900	909
918	927	
215	220	225
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys		
TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA		
936	945	954
963	972	
230	235	240
Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn		
GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC		
981	990	999
1008	1017	
245	250	255
Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe		
CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC		
1026	1035	1044
1053	1062	
260	265	270
Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr		
AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC		
1071	1080	1089
1098	1107	
275	280	285
Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala		
CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA		
1116	1125	1134
1143	1152	

Fig. 1/3

Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala
CCA	CCC	TAT	CAG	GGG	GCT	GAC	CCC	ATC	CTT	GCG	ACA	GCC	CTC	GCC
1161			1170				1179		1188			1197		
			290					295					300	
Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala
TCC	GAC	CCC	ATC	CCC	AAC	CCC	CTT	CAG	AAG	TGG	GAG	GAC	AGC	GCC
1206			1215				1224		1233			1242		
			305					310					315	
His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr
CAC	AAG	CCA	CAG	AGC	CTA	GAC	ACT	GAT	GAC	CCC	GCG	ACG	CTG	TAC
1251			1260				1269		1278			1287		
			320					325					330	
Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Trp				
GCC	GTG	GTG	GAG	AAC	GTG	CCC	CCG	TTG	CGC	TGG	AA	<u>GGAATTC</u>		
1296			1305				1314		1323			1332		
			335					340						

Fig. 2

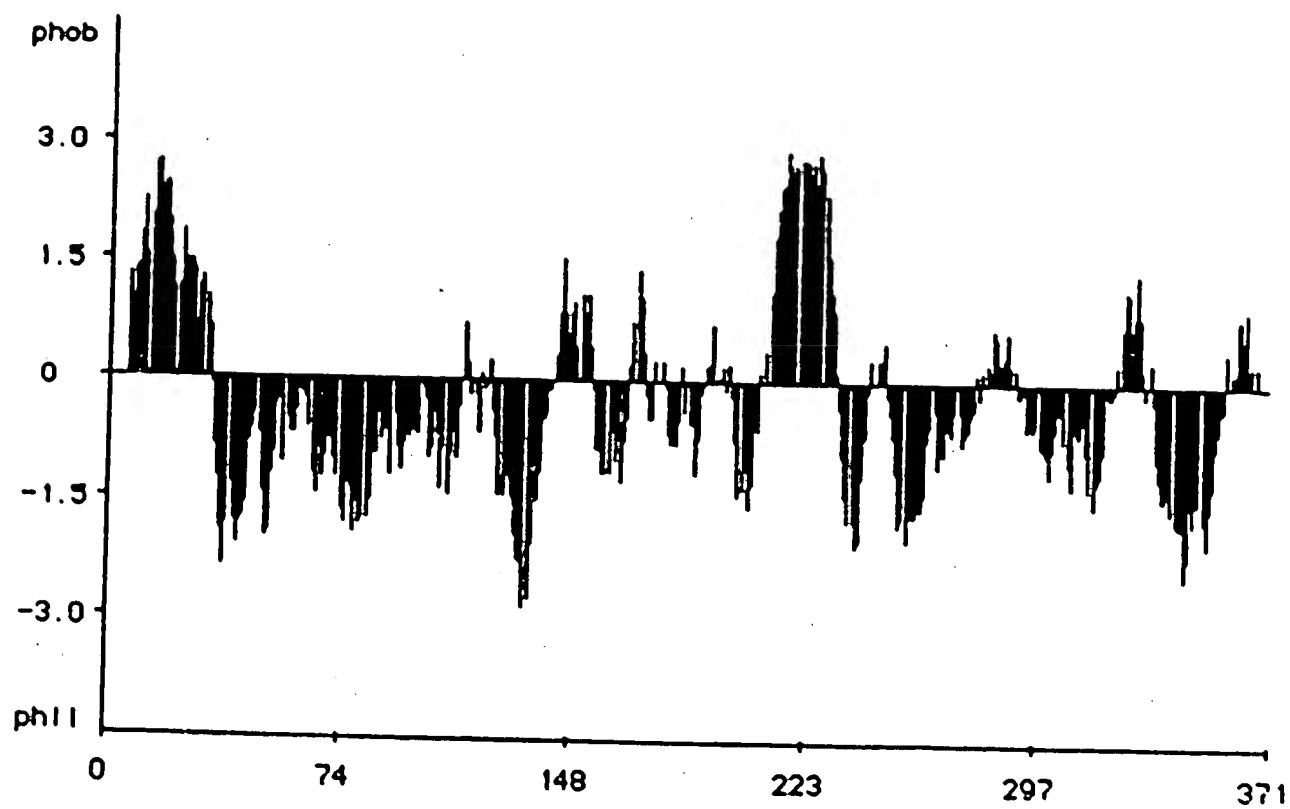


Fig. 1/1

GAATTCTCTGGACTGAGGCTCCAGTTCTGGCCTTTGGGG

TTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCCGAGTCTCAACCCCTCAACTGTC

ACCCCAAGGCACTTGGGACGTCCTGGACAGACCGAGTCCCGGGAAGCCCCAGCACTGCC

GCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGGCCA TAG CTG TCT GGC

S1		S5		S10		S15
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu						
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC						
216		225		234		243

	S20		S25		S29	1
Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu						
CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG						
261	270		279		288	297

	5		10		15
Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro					
GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC					
306	315		324		333

	20		25		30
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr					
CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC					
351	360		369		378

	35		40		45
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro					
AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG					
396	405		414		423

	50		55		60
Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr					
GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC					
441	450		459		468

	65		70		75
Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys					
GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC					
486	495		504		513

	80		85		90
Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp					
CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC					
531	540		549		558

	95		100		105
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr					
CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT					
576	585		594		603

	110		115		120
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu					
TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC					
621	630		639		648